UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II
Unités d'Enseignement et de Recherche
des Sciences médicales et pharmaceutiques

Année 1974 – Thèse n° 667

Contribution à l'étude de l'azote aminé fécal Nouvelle méthode coprologique du dosage de l'ammoniaque

Thèse pour le Doctorat de l'Université
(Mention Pharmacie)
Présentée et soutenue publiquement
le vendredi 1er février 1974

par Liliane DUBOURG née CASAMAYOU
née le 22 mars 1940 à Pau (Pyrénées-Atlantiques)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. J. BAILENGER	Professeur	Président
M. F. TAYEAU	Professeur	Juges
M. J.-J. DUBARRY	Professeur	
M. R. PAUTRIZEL	Professeur	
M. R. CROCKETT	Professeur	

Éditions Bergeret, 71, rue Leyteire – BORDEAUX
Tél. (56) 91.12.59

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II
Unités d'Enseignement et de Recherche
des Sciences médicales et pharmaceutiques

Année 1974 – Thèse n° 667

Contribution à l'étude de l'azote aminé fécal Nouvelle méthode coprologique du dosage de l'ammoniaque

Thèse pour le Doctorat de l'Université

(Mention Pharmacie)

Présentée et soutenue publiquement
le vendredi 1er février 1974

par Liliane DUBOURG née CASAMAYOU
née le 22 mars 1940 à Pau (Pyrénées-Atlantiques)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. J. BAILENGER	Professeur	Président
M. F. TAYEAU	Professeur	Juges
M. J.-J. DUBARRY	Professeur	
M. R. PAUTRIZEL	Professeur	
M. R. CROCKETT	Professeur	

Éditions Bergeret, 71, rue Leyteire – BORDEAUX
Tél. (56) 91.12.59

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MES GRANDS-PARENTS

A MES PARENTS

A MA BELLE-MERE

Avec toute ma tendresse.

A MON BEAU-PERE

Le Professeur G. DUBOURG

Veuillez trouver ici un témoignage de ma profonde affection et de ma reconnaissance.

A MON MARI

A MA FILLE

A MES FRERES

A MES BEAUX-FRERES

A MES BELLES-SŒURS

A TOUTE MA FAMILLE

A TOUS MES AMIS

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur R. CROCKETT

Professeur de Biochimie pharmaceutique
Licencié ès Sciences
Assistant de Biochimie des Hôpitaux de Bordeaux
Chevalier des Palmes académiques

Nous avons été très sensible à l'excellent accueil que vous nous avez réservé.
Nous vous exprimons notre sincère gratitude.

Monsieur le Professeur R. PAUTRIZEL

Professeur d'Immunologie et Biologie parasitaire
Membre de l'Académie de Médecine
Biologiste des Hôpitaux
Docteur ès Sciences
Expert de l'Organisation Mondiale de la Santé
Officier de l'Ordre National du Mérite
Croix de Guerre 1939-1945
Officier des Palmes académiques
Médaille de Vermeil du Service de Santé de la Marine
Officier du Mérite Sénégalais

Nous vous exprimons nos plus vifs remerciements pour l'honneur que vous nous faites en siégeant à notre jury de Thèse.

Monsieur le Professeur J.J. DUBARRY

Professeur d'Hydro-climatologie thérapeutique
et de Clinique des Maladies de l'appareil digestif
Médecin des Hôpitaux, Chef de Service
à l'Hôpital Saint-André
Chevalier de la Légion d'Honneur
Officier des Palmes académiques
Officier du Mérite social
Cavaliere Ufficiale nell ordine al Merito della
Reppublica Italiana
Commandeur de l'Ordre du Mérite civil espagnol

En vous remerciant d'avoir bien voulu accepter de juger notre travail, permettez-nous de vous assurer de notre profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur F. TAYEAU

Doyen Honoraire de la Faculté de Médecine et de Pharmacie
Professeur de Biochimie médicale A
Membre titulaire de l'Académie nationale de Médecine
Médecin Biologiste des Hôpitaux, Chef de Service
Docteur ès Sciences
Officier de la Légion d'Honneur
Commandeur des Palmes académiques
Officier de l'Ordre national du Mérite
Chevalier de la Santé publique
Chevalier du Mérite agricole
Médaille de Vermeil du Service de Santé de la Marine
Officier du Mérite scientifique
Grand Croix de l'Ordre du Saint-Sépulcre de Jérusalem
Commandeur de l'Ordre national Sénégalais
Commandeur de l'Ordre national Ivoirien
Titulaire de l'Ordre Sépasse (1ère Classe) Iran
Titulaire (2ème Degré) de la Décoration Danesh (Iran)
Officier de l'Ordre national du Cèdre (Liban)
Docteur Honoris causa de l'Université de Téhéran (Iran)
Professeur Honoraire de l'Université San Marcos de Lima (Pérou)

Vous nous avez accueillie avec bienveillance dans votre service.
Veuillez trouver ici le témoignage de notre sincère reconnaissance et l'expression de nos remerciements pour l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de siéger à notre jury.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur J. BAILENGER

Professeur de Zoologie et Biologie animale
Docteur ès Sciences
Officier des Palmes académiques

Vous nous avez toujours accordé vos conseils et vos encouragements tout au long de nos études et lorsque vous nous avez acceuillie dans votre laboratoire. Que ce travail soit le témoignage de notre reconnaissance. Vous nous faite le très grand honneur de présider ce jury, veuillez trouver ici l'expression de nos très vifs remerciements.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'AZOTE AMINE FECAL

NOUVELLE METHODE COPROLOGIQUE DU DOSAGE DE L'AMMONIAQUE

(Travail effectué au Laboratoire
de Zoologie et Biologie animale - J. BAILENGER)

-:-

S O M M A I R E

I N T R O D U C T I O N

1ère Partie : Dosage de l'ammoniaque et des dérivés aminés par la technique au formol

I - Dosage des acides aminés : méthode de Sörensen
II - Dosage de l'ammoniaque : méthode de Ronchese

2ème Partie : Valeur de la méthode au formol appliquée au dosage de l'azote aminé fécal par GOIFFON et NEPVEUX ; modifications

I - La méthode de Goiffon et Nepveux
II - Valeur de la méthode de Goiffon et Nepveux
III - Essais de modifications de la méthode de Goiffon et Nepveux

3ème Partie : Dosage spécifique de l'ammoniaque

I - Méthode de Lubochinsky et Zalta
II - Etude analytique de la méthode de Lubochinsky et Zalta

4ème Partie : Application de la technique de Lubochinsky et Zalta au dosage de l'ammoniaque dans les selles

I - Méthode
II - Interprétation des résultats fournis par la méthode de Lubochinsky et Zalta et par la méthode de Goiffon et Nepveux

C O N C L U S I O N S

I N T R O D U C T I O N

Les protides constituent une part importante de notre alimentation. Sous l'action des enzymes protéolytiques, ils subissent une dégradation progressive jusqu'au stade d'acides aminés, qui sont absorbés au niveau de l'intestin grêle. Il peut subsister quelques polypeptides, qui sont finalement résorbés sous cette forme. Les constituants résiduels, négligeables dans des conditions physiologiques, sont dégradés jusqu'au stade d'indol, de scatol, de putrescine, de cadavérine... normalement présents dans les selles. Ainsi, à la fin de l'iléon comme au niveau du caecum, les produits de la digestion des protéines sont relativement peu abondants. Dans le gros intestin et plus particulièrement dans le côlon descendant et la partie gauche du côlon transverse, ces déchets continuent à être attaqués jusqu'au stade d'amine et d'ammoniaque. En fait, la majeure partie des amines et de l'ammoniaque trouvée dans les selles provient de composés protéiques d'origine pariétale.

Deux conditions sont donc nécessaires pour que ces dérivés azotés apparaîssent en quantité anormale :

1°) irritation ou lésion de la muqueuse,

2°) stagnation suffisante dans le côlon pour que la flore protéolytique ait le temps d'agir.

Parmi les causes d'irritation de la muqueuse on peut citer :

- un dysfonctionnement de la digestion microbienne, tel celui aboutissant à une production excessive d'acides organiques,
- une infection intestinale,
- une irritation thérapeutique.

Quant à la stagnation, elle est réalisée à son maximum dans la constipation.

Les deux processus (stagnation et irritation) interviennent conjointement dans les phénomènes correspondant à la fausse diarrhée, c'est dans ce cas que l'on a le plus de chances de trouver un taux d'ammoniaque très élevé.

La méthode la plus classique pour le dosage fécal de l'azote est celle de Goiffon et Nepveux. Son principe repose sur la combinaison de l'azote aminé avec le formol. Elle se prête aisément aux analyses en série, mais ses résultats correspondent à un ensemble aminé : acides aminés, amines et sels ammoniacaux.

Du point de vue putréfaction, il ne semble pas qu'une même signification puisse être attribuée aux acides aminés d'une part, aux amines et à l'ammoniaque d'autre part. C'est pourquoi nous avons cru intéressant de mettre au point une technique spécifique de l'ammoniaque et de comparer ses résultats à ceux fournis par la méthode globale de Goiffon.

Cette conception nous semble justifiée par cette remarque de POLONOVSKY et COLIN : "La présence d'acides aminés en quantité excessive dans les selles (diarrhée du grêle, accélération du transit) est une très grande cause d'erreur. En effet la formol-titration intéresse à la fois l'ammoniaque et les acides aminés. Or, dans beaucoup de diarrhées, l'amino-acidorrhée est importante : ce fut le cas en particulier des quelques cas de diarrhée par intolérance aux sucres que nous avons suivies. Comment, dès lors, interpréter un chiffre élevé comme un signe de colite ou de putréfaction ?"

Deux critères ont guidé le choix et la mise au point d'une technique :

- spécificité à l'égard de l'ammoniaque,
- simplicité en vue d'une utilisation courante par le laboratoire de biologie clinique.

Le plan que nous avons adopté est le suivant :

- Une première partie est consacrée à une étude critique de la technique au formol et des résultats que l'on peut en attendre.

- La deuxième partie est consacrée à la technique de Goiffon et Nepveux ainsi qu'à des essais de modifications en vue d'une plus grande précision par :

  . indicateurs de pH,
  . résines échangeuses d'ions.

- Dans la troisième partie, nous étudions un dosage spécifique de l'ammoniaque grâce à la méthode de Lubochinsky et Zalta.

- Enfin, dans le dernier chapitre, nous envisageons l'application de cette dernière méthode au dosage de l'ammoniaque dans les selles.

PREMIERE PARTIE

Dosage de l'ammoniaque et des dérivés aminés par la technique au formol

-:-

Le formol est susceptible de se combiner aux sels ammoniacaux et aux dérivés aminés pour donner des composés titrables par acidimétrie.

Ce principe a permis d'envisager des applications portant sur les acides aminés, sur l'ammoniaque et sur les milieux biologiques en renfermant.

-:-

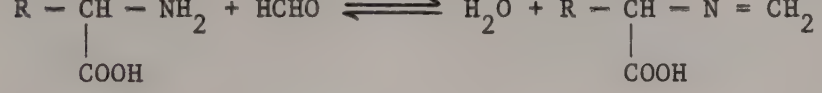
- I -

DOSAGE DES ACIDES AMINES
METHODE DE SORENSEN

A - *PRINCIPE*

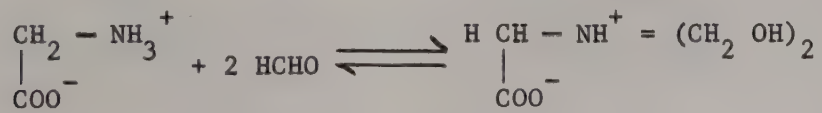
Von Hugo SCHIFF en 1899-1902 établit que l'addition de formol à une solution neutre d'amino-acides lui confère une acidité.

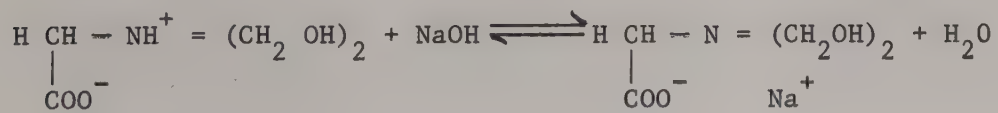
SORENSEN explique la réaction par ce schéma :



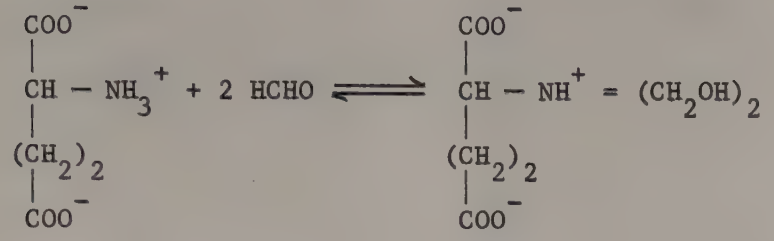
Ultérieurement BRONSTED (1928), LEVY (1933) et LE HENAFF (1965) ont modifié cette hypothèse et admettent les réactions suivantes que confirment JENSEN et LARROUDE (1970).

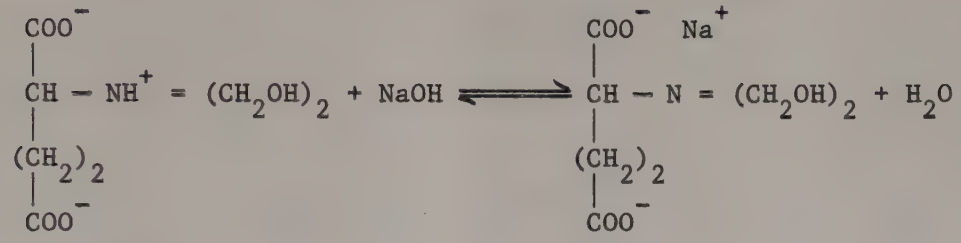
a) Acides mono aminés mono carboxyliques :



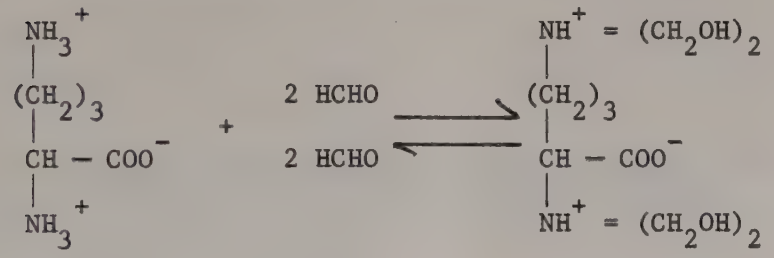


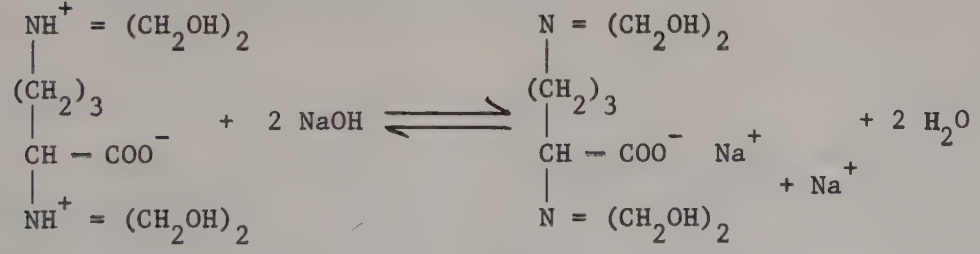
b) *Acides mono aminés dicarboxyliques :*



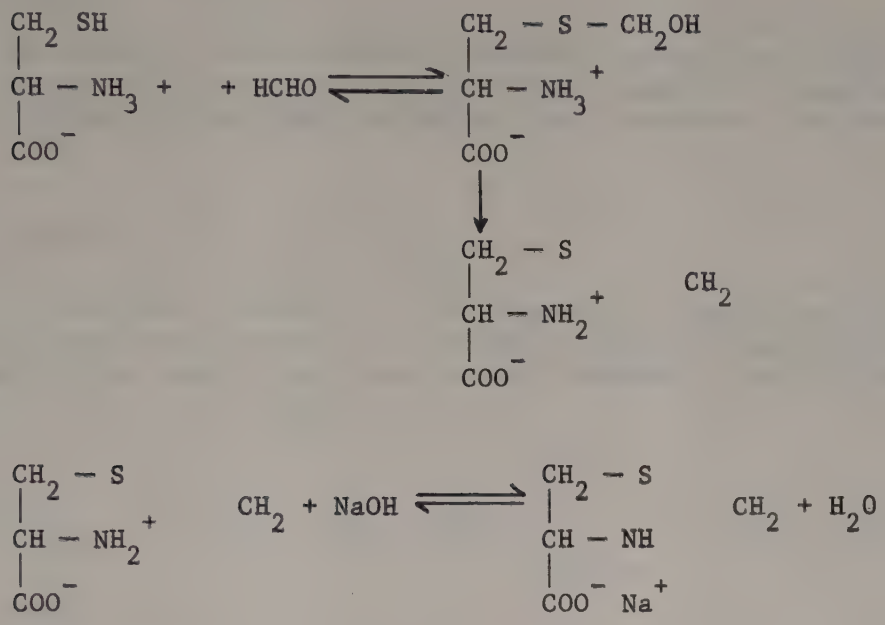


c) *Acides diaminés mono carboxyliques :*





d) Acides aminés soufrés :



B - FACTEURS

D'après SORENSEN, l'exactitude du dosage des acides aminés est de 95 % à condition de respecter certains facteurs :

- pH,
- quantité de formol,
- titre de la solution alcaline.

1 - pH :

C'est avant tout une méthode fondée sur le pH. En effet, SORENSEN détermine que le dosage de l'acidité libérée n'est exact que si la neutralisation des carboxyles est faite à pH = 9 ou 9,5, car le coefficient de dissociation de la majorité des acides aminés est suffisamment élevé à ce pH.

L'indicateur de pH recommandé par SORENSEN est le phtaléine du phénol, qui prend une teinte rouge vif à ce pH de 9 - 9,5.

2 - FORMOL :

La réaction étant réversible, SORENSEN préconise l'emploi d'un excès de formol de titre connu de façon à faire pencher l'équilibre dans le sens de la formation du dérivé méthylénique comportant une fonction titrable.

3 - TITRE DE LA SOLUTION ALCALINE :

Le titre de la soude doit être aussi voisin que possible de N/5. La dilution correspondant à une soude N/10 apporterait trop d'eau et la réaction ne serait plus quantitative. SORENSEN a constaté des erreurs de 40 % sous cette influence.

C - REACTIFS

1) *Soude N/5.*

2) *Acide chlorhydrique N/5.*

3) *Solution de phtaléine du phénol* à 1 pour 200 dans l'alcool éthylique à 95°.

4) *Solution de formol neutralisée :*

La solution officinale d'aldéhyde formique est neutralisée extemporanément par de la soude N/5 en présence de phénol phtaléine jusqu'à obtention d'une teinte rose pâle.

D - TECHNIQUE (*tableau n°I*)

1ère phase : alcalinisation du témoin (ph = 8,8) :

On prépare un témoin avec :

- 20 ml d'eau (privée de CO_2)
- 10 ml de formol neutralisé,
- 2 ml de soude N/5.

Dans ce mélange, on verse de l'acide chlorhydrique N/5 jusqu'à ramener la teinte rouge au rose pâle (b ml). Il faut bien agiter et

attendre pour s'assurer de la persistance de cette coloration. On se trouve alors au premier stade de la titration : il correspond au ph = 8,3.

On ajoute de la soude N/5 pour faire passer la teinte au rouge franc : c'est le second stade de titration, il correspond au pH = 8,8. La quantité de soude versée est notée : n_1.

2ème phase : alcalinisation de la solution à doser (pH = 8,8) :

la solution d'amino acides ne doit contenir ni carbonates, ni phosphates, ni ammoniaque. On effectue le dosage sur une prise d'essai de 20 ml. On ajoute 10 ml de formol neutralisé puis de la soude N/5, jusqu'à coloration rouge très nette, plus forte que celle du témoin, soit C_1 ml.

3ème phase : ajustement du témoin à pH = 9,1 :

on ajoute II gouttes (n_2 ml) de soude au témoin dont la coloration rouge intense correspond aussi au pH = 9,1.

4ème phase : ajustement de la solution à doser à pH = 9,1 :

la solution à doser est décolorée jusqu'au rose pâle avec a_1 ml d'acide chlorhydrique N/5. On ramène à une teinte rouge vif comparable à celle du témoin à l'aide de la solution titrée de soude soit C_2 ml.

E - CALCULS

Le volume de soude titrée utilisée pour ajuster le pH à la valeur 9,1 a permis d'une part la titration des acides aminés et d'autre part l'alcalinisation du milieu. Pour connaître la fraction correspondant aux acides aminés et donc pour les doser, il faut déduire du volume total employé celui nécessaire à la seule alcalinisation. C'est le témoin qui nous le donne.

Volume de soude utilisée dans le dosage :

$$\left[C_2 + C_1 \right] - a_1 = V$$

Volume de soude permettant l'alcalinisation du milieu :

$$\left[n_1 + n_2 + 2 \right] - b = v$$

Volume de soude N/5 correspondant aux acides aminés :

$$V - v = N$$

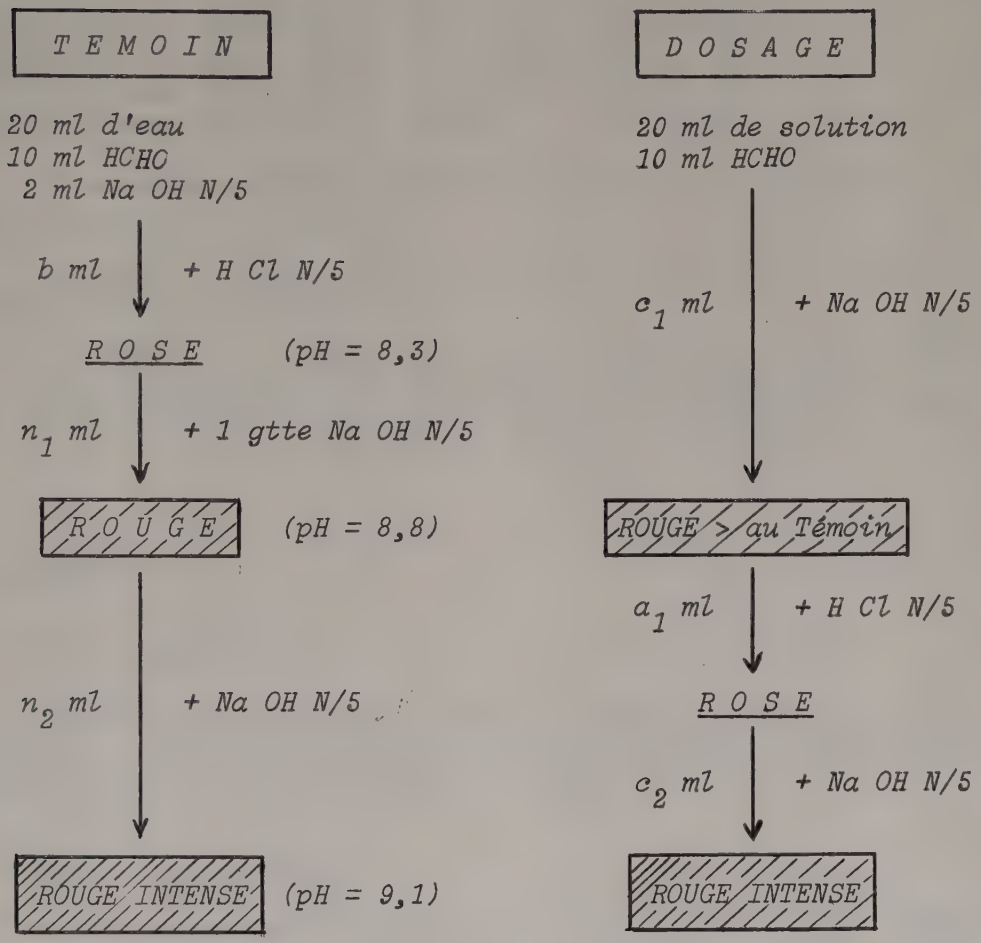
Les résultats sont exprimés en milligrammes d'azote pour la prise d'essai par le calcul suivant : 1 ml de soude N/5 correspond à 2,8 mg d'azote.

N ml de soude N/5 correspondent à (2,8 × N) mg d'azote.

(Voir tableau n°1, page suivante).

TABLEAU I

Dosage des acides par la méthode de Söerensen



$(n_1 + n_2 + 2)$ = volume total de Na OH N/5 versé

b = volume d'H Cl N/5 versé

* $v = (n_1 + n_2 + 2) - b$ =
vol. Na OH N/5 versé pour le témoin

* $V = (C_1 + C_2) - a_1$

$N = V - v$

F - RESULTATS

La méthode de Sörensen ne dose pas tous les acides aminés avec le même pourcentage :

Glycocolle	98 p 100	Lysine	92,5 p 100
Alanine	98 p 100	Histidine	89 p 100
Ac.Aspartique	97 p 100	Leucine	97 p 100
Ac.Glutamique	99 p 100	Sérine	98 p 100

- L'arginine ne réagit que par son groupement α aminé, le groupement guanidique ne réagit pas.

- La tyrosine donne un pourcentage trop élevé : 105,5 p 100, ce qui tient à sa fonction phénol.

- La proline ne contient pas de groupement aminé - NH_2, mais un groupe = NH ; la formolisation révèle une teneur très inférieure à celle qui existe réellement. Elle est de 80 p 100 en présence de phénol phtaléine et de 92 p 100 en présence de thymol phtaléine.

G - INCONVENIENTS

1) Méthode compliquée :

Cette méthode de dosage des acides aminés est beaucoup trop compliquée pour pouvoir envisager de la pratiquer journellement dans un laboratoire, surtout lorsqu'il s'agit de dosages en série.

2) Manque de spécificité :

Cette méthode fut mise au point pour les acides aminés. Mais en fait elle ne dose pas que ces substances. En effet, si nous avons un liquide biologique contenant des acides aminés et des sels ammoniacaux, il est sûr que tous ces composés interfèrent et sont dosés en même temps. Ce que l'on dose alors, c'est la teneur en - NH_2 globale sans qu'il y ait une dissociation possible.

3) Difficulté liée à la technique, l'appréciation de la fin du dosage :

Le virage au rouge de la phénol phtaléine étant très progressif il est difficile de déterminer exactement le terme du dosage. L'addition d'un volume supplémentaire de soude apporte un changement de

coloration imperceptible pour le manipulateur de sorte que des erreurs par défaut ou par excès sont commises. L'utilisation d'un témoin pourrait aider à repérer la coloration signalant le terme du dosage si le liquide biologique à doser était incolore, mais hélas, ce n'est pas toujours le cas. Dans ces conditions, le terme du dosage est lié à l'appréciation du technicien.

- II -

DOSAGE DE L'AMMONIAQUE
METHODE DE RONCHESE

Le dosage de l'ammoniaque par la méthode de RONCHESE (1915) est fondée sur le même principe d'action du formol.

A - *PRINCIPE*

Lorsqu'on ajoute du formol à une solution de sels ammoniacaux elle devient acide.

a) *Ammoniaque* :

Le formol agit comme oxydant et son oxygène forme de l'eau avec l'hydrogène ammoniacal. L'azote libéré fixe le reste = CH_2 du formol en donnant l'hexaméthylène tétramine :

$$4\ NH_3 + 6\ HCHO \longrightarrow 2\ H_2O + (CH_2)_6\ N_4$$

b) *Sels ammoniacaux* :

La réaction est semblable à la précédente, mais l'acide du sel ammoniacal est mis en liberté.

$$4\ NH_4Cl + 6\ HCHO \rightleftharpoons 6\ H_2O + (CH_2)_6\ N_4 + 4\ HCl$$

C'est cet acide libéré que RONCHESE dose au moyen d'une solution alcaline titrée. De la quantité d'acide dosé, on déduit celle de l'ammoniaque salifiée.

CAMBIER et BROCHET (1895) montrent qu'il s'agit d'une réaction réversible et déterminent les conditions pour qu'elle soit quantitative.

RONCHESE, en 1908, détermine la quantité de formol à mettre en excès pour que le dosage soit précis.

B - REACTIFS

1) *Phénol phtaléine en solution au 1/200e dans l'éthanol à 95°.*

2) *Soude N/10.*

3) *Formol à 40 p 100* dilué au 1/2 et neutralisé par de la soude N/10 jusqu'à virage au rose pâle de la phénol phtaléine.

C - TECHNIQUE

Mettre dans un verre à expérience :

- 10 ml d'une solution de sels ammoniacaux,
- 100 ml d'eau distillée, de préférence privée de gaz carbonique par ébullition,
- V gouttes environ de la solution alcoolique de phénol phtaléine.

Verser de la soude décinormale jusqu'a teinte rose pâle.

Ajouter 10 ml de la solution de formol neutralisé. Le mélange se décolore. Faire réapparaître la couleur légèrement rose avec de la soude N/10 dont on mesure le volume : n.

D - CALCULS

Un millilitre de soude N/10 correspond à 1,7 mg d'ammoniaque; la quantité d'ammoniaque de la prise d'essai est : $n \times 1,7$.

E - VALEUR DE LA TECHNIQUE

1) Simplicité :

Le dosage de l'ammoniaque par la technique de Ronchese est satisfaisante par sa simplicité. Elle peut de ce fait être mise en oeuvre rapidement et se prêter à des analyses en série.

2) Reproductibilité :

Les sels d'acides forts qui sont dissociés au début du virage de la phénol phtaléine (rose pâle) sont dosés entièrement à ce pH. Les acides faibles ne sont dosé que partiellement, car leur dissociation ne se fait qu'à un pH plus alcalin. Il est très facile pour le technicien de repérer l'apparition de la couleur rose pâle surtout lorsque le dosage s'effectue sur un milieu incolore. En revanche, si le liquide présente une coloration au départ, le rose naissant de la phénol phtaléine sera plus difficile à apercevoir et c'est dans ces conditions que la reproductibilité peut être mise en doute.

3) Spécificité :

Le dosage de Ronchese ne présente aucune spécificité vis-à-vis de l'ammoniaque, puisqu'il dose aussi bien à différents degrés les acides aminés. Les résultats obtenus ne traduisent pas de valeur précise lorsqu'il s'agit d'un liquide biologique. Cette méthode, ne répondant pas à nos critères de départ, a dû être abandonnée en faveur d'une autre technique.

D E U X I E M E P A R T I E

Valeur de la méthode au formol
appliquée au dosage de l'azote aminé fécal
par GOIFFON et NEPVEUX ;
modifications

-:-

GOIFFON et NEPVEUX (1949) ont appliqué l'action du formol au dosage de l'ammoniaque et des acides aminés dans les selles.

Après avoir rappelé les conditions techniques de leur méthode, nous étudierons son intérêt et nous essayerons de lui apporter des modifications.

-:-

- I -

METHODE DE GOIFFON ET NEPVEUX

A - *REACTIFS*

a) Formol à 40 p 100 dilué au demi.

b) Solution alcoolique de phénol phtaléine.

c) Soude N/10.

d) Acide chlorhydrique à 2 p 100.

B - *TECHNIQUE*

a) *Clarification de la dilution fécale :*

Les selles sont diluées à 10 p 100 avec de l'eau. La dilution est clarifiée par addition de perchlorure de fer (1 ml pour 150 ml de dilution) et d'un excès de chaux. Par filtration, on obtient un liquide limpide, coloré en jaune plus ou moins foncé sur lequel on dose les amines et les acides aminés.

b) *Dosage :*

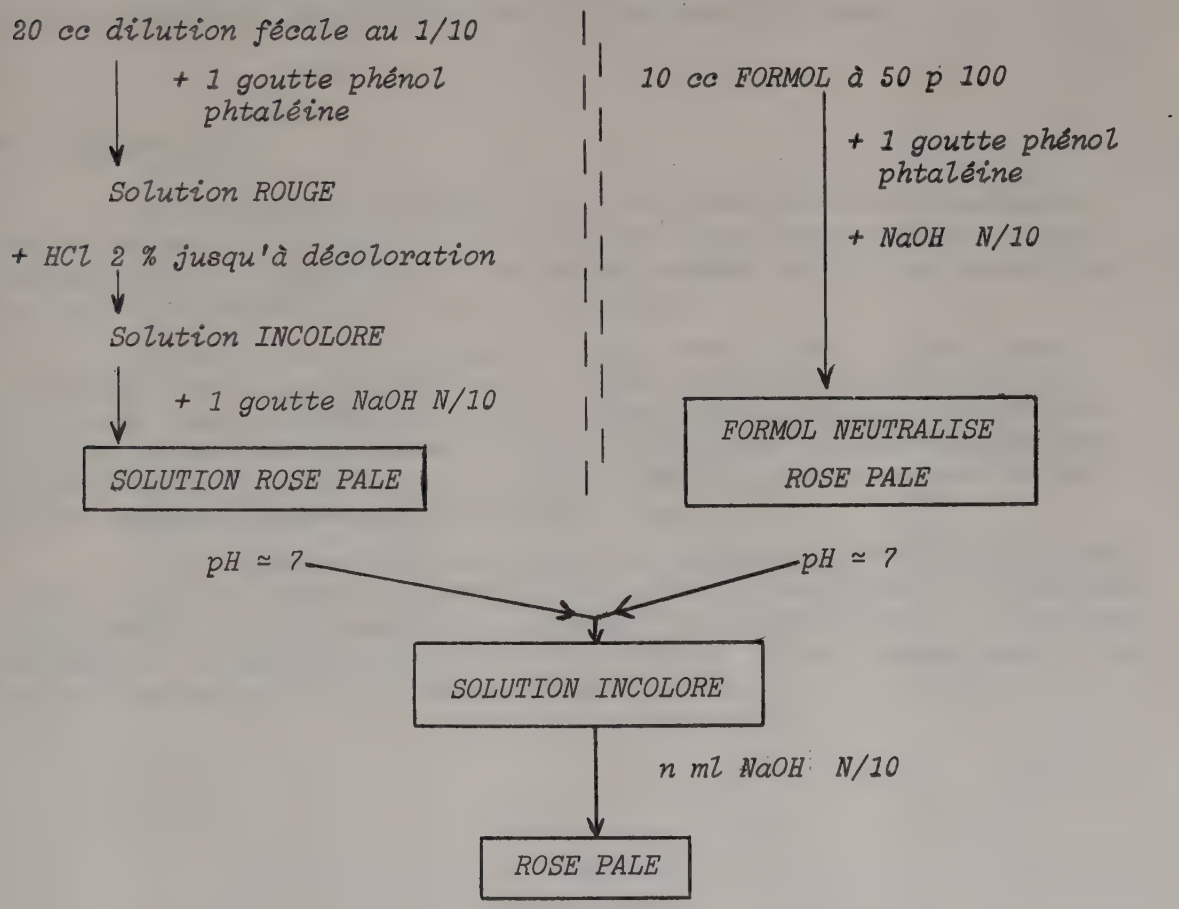
Vingt millilitres de filtrat sont prélevés et introduits dans un bécher ; on y ajoute I à II gouttes de phénol phtaléine. Le milieu étant très alcalin par suite du traitement à la chaux, il prend une

teinte rouge vif. On décolore par de l'acide chlorhydrique à 2 p 100 puis on ramène à la teinte rose pâle avec de la soude N/10 ; le pH est alors de 8.

L'introduction de 10 ml de formol neutralisé libère l'acidité et la solution devient incolore. Cette acidité est dosée à l'aide de soude N/10 en prenant comme terme de la réaction l'apparition d'une teinte rose pâle (voir tableau II).

TABLEAU II

Méthode de Goiffon et Nepveux



C - CALCULS

n millilitres de soude N/10 correspondent à 20 ml d'une solution fécale au 1/10e

$$\frac{n \times 50}{10} = 5\ n \text{ millilitres de soude N}$$

correspondent à l'ammoniaque et aux acides aminés de 100 g de selles.

D - AVANTAGES

Son principal avantage est sa simplicité qui justifie son emploi courant dans les laboratoires de biologie clinique.

E - INCONVENIENTS

D'après les conclusions que nous avons pu tirer précédemment des méthodes de Sörensen et Ronchèse, nous nous sommes demandé dans quelle mesure l'ammoniaque et les acides aminés sont effectivement dosés par cette méthode de Goiffon et Nepveux.

On sait, en effet, que les sels ammoniacaux d'acides forts sont dosés au pH auquel débute le virage de la phénol phtaléine (pH = 8,1), mais que le dosage total des acides aminés nécessite un pH très alcalin (9,1). Dans les conditions de la méthode de Goiffon et Nepveux, il semble que l'on soit amené à doser l'ammoniaque et une partie des acides aminés variable d'ailleurs avec leur nature.

S'il en est ainsi, les résultats traduisent la teneur en ammoniaque avec une erreur par excès et du point de vue global l'erreur est par défaut ; d'où l'intérêt de faire une étude analytique de la méthode de Goiffon et Nepveux sur des solutions pures de sels ammoniacaux d'une part, d'acide aminés et d'amines d'autre part.

- II -

VALEUR DE LA METHODE DE GOIFFON ET NEPVEUX

Nous avons procédé à des essais de la méthode de Goiffon et Nepveux sur des solutions pures de sels ammoniacaux, d'amines et d'acides aminés afin de déterminer dans quelles proportions ils sont dosés.

A - METHODE

Afin de nous replacer dans les mêmes conditions que les dilutions fécales, chaque solution est traitée par un excès de chaux. Après avoir laissé en contact cinq minutes environ, nous filtrons.

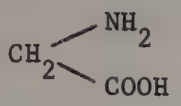
20 ml de filtrat sont alors placés dans un bécher et neutralisés par de l'acide chlorhydrique à 2 p 100 en présence de phénol phtaléine jusqu'à décoloration ; on revient au rose pâle avec le minimum de soude N/10.

Dix millilitres de formol officinal dilué au demi sont neutralisés en présence de phénol phtaléine et ajoutés à la solution à doser.

Toute coloration rose ayant disparu, on la fait réapparaître avec de la soude N/10 dont le volume versé est noté.

Nous exprimons les résultats en mg d'azote pour 100 ml de solution à doser. Les calculs sont fondés d'une part sur l'équivalence soude N/10 - acide à doser et d'autre part sur le pourcentage d'azote de la molécule.

Exemple : cas du glycocolle :



PM : 75

une fonction acide

azote : 18,6 p 100

Prise d'essai : 20 ml

1 ml de soude N/10 correspond à $\frac{75}{10 \times 1000}$ soit 7,5 mg de glycocolle.

n ml de soude N/10 correspond à n × 7,5 mg de glycocolle dans la prise d'essai soit : n × 7,5 × 5 mg de glucocolle pour 100 ml.

Azote en mg pour 100 ml :

$$\frac{18,6\ (n \times 7,5 \times 5)}{100}$$

B - RESULTATS

1) *Sels ammoniacaux* :

A partir d'une solution-mère de chlorure d'ammonium à 5 p 1000 nous réalisons des dilutions de plus en plus grandes 1/2, 1/4, 1/8, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/100.

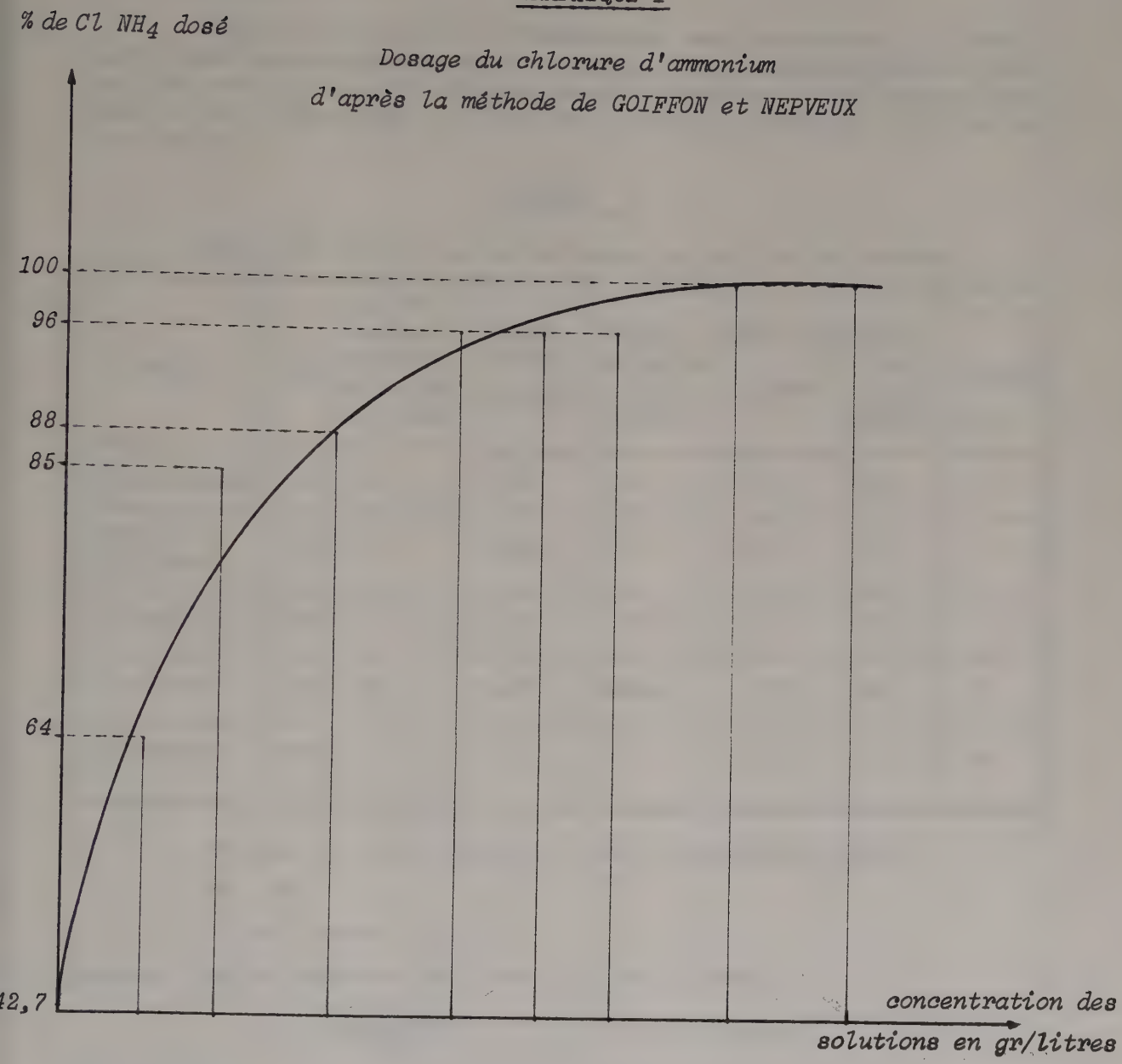
Le tableau III (page suivante) montre que l'erreur est d'autant moindre que la concentration en chlorure d'ammonium est plus élevée (graphique I, page 28). En effet, il faut atteindre une concentration de 2,5 p 1000 pour que le dosage soit précis. Au contraire, pour les solutions à 0,05 p 1000, les erreurs par défaut atteignent 58 p 100. Or de telles concentrations en azote reproduisent à peu près celles des dilutions fécales. Le dosage de l'ammoniaque effectué dans ces conditions risque donc de traduire des résultats très nettement inférieurs à la réalité.

TABLEAU III

Dosage du chlorure d'ammonium
par la technique de Goiffon-Nepveux

Cl NH_4 (g/1000)	*Soude N/10 pour 20 ml*	*Azote théorique (mg/100 ml)*	*Azote dosé (mg/100 ml)*	*p 100 d'azote dosé*
5	19	131	132,5	100
2,5	9,6	65,5	67	100
1,25	4,5	32,75	31,5	96
0,62	2,2	16,4	15,75	96
0,5	1,8	13,1	12,6	96
0,25	0,83	6,55	5,8	88
0,12	0,4	3,27	2,8	85
0,06	0,1	1,64	1,05	64
0,05	0,08	1,31	0,56	42,7

GRAPHIQUE I


% de Cl NH4 dosé
Dosage du chlorure d'ammonium
d'après la méthode de GOIFFON et NEPVEUX
100
96
88
85
64
42,7
concentration des
solutions en gr/litres

2) *Amines* :

Toutes les solutions d'amines que nous soumettons à la technique de Goiffon sont préparées de façon que leur concentration en azote soit équivalente à celle que nous rencontrons dans les dilutions fécales, c'est-à-dire comprises entre 85 et 104 mg d'azote pour 100 ml (voir tableau IV).

TABLEAU IV

Dosage des amines par la technique de Goiffon et Nepveux

Amines	*P.M.*	*p. 100 azote titrable dans la molécule*	*Concentration (g/100ml)*	*Azote titrable (mg/100ml)*	*NaOH N/10 (ml/20ml)*	*Azote dosé (mg/100ml)*	*p. 100 d'azote dosé*
Ethanolamine	61	22	0,46	101	14,4	100	99
Phényl-éthylamine	121	11	0,92	101	14	98	97
Cadavérine	102	27	0,34	91,8	12,5	87,5	95
Putrescine	88	32	0,33	105,6	12,9	90,3	85
Histamine	184	6,6	1,4	92	11,1	77,5	84

Exemple de préparation de la solution de putrescine :

PM = 88

p 100 d'azote = 31,8

sachant que la solution doit être à 106 mg d'azote :

$$\frac{100 \times 0,106}{31,8} = 0,33 \text{ g de Putrescine}$$

pour 100 ml.

Les pourcentages d'azote que nous retrouvons dans nos solutions par ce dosage sont ici variables. Aucune solution d'amine n'est dosée en totalité, bien que nous en retrouvions la majeure partie. L'Histamine qui est la moins dosée présente un résultat par défaut de 28 p 100.

3) *Acides aminés :*

Toutes les solutions d'acides aminés que nous soumettons à la technique de Goiffon et Nepveux ont, comme pour les amines, des concentrations en azote équivalentes à celles des dilutions fécales, c'est-à-dire 104 mg d'azote pour 100 ml ou moins (voir tableau V).

TABLEAU V

Dosage des acides aminés par la technique de Goiffon et Nepveux

Amines	*P.M.*	*p 100 azote titrable dans la molécule*	*Concentration (g/100ml)*	*Azote titrable (mg/100ml)*	*NaOH N/10 (ml/20ml)*	*Azote dosé (mg/100ml)*	*p 100 d'azote dosé*
Sérine	105	13	0,79	102,7	14,4	100,5	97
Taurine	125	11,2	0,94	105,2	13,8	96,5	91
Glycocolle	75	18,6	0,56	104	13,6	95	91
Cystéine	175	8	1,3	104	8,2	57,4	55
Lysine	146	19,1	0,55	105	7,5	52,5	50
Alanine	89	15,7	0,67	105	7	49	46
Leucine	131	10,6	1	106	6,4	44,8	42
Arginine	176	15,9	0,56	89	5	35	39
Tryptophanne	204	6,8	1,5	102	5	35	34
Histidine	155	9	1,3	117	5,2	36,4	31
Tyrosine	181	7,7	1,3	100	2,5	17,5	17

Exemple de préparation d'une solution de Glycocolle à 104 mg d'Azote pour 100 ml :

Glycocolle PM = 75
p 100 d'azote = 18,6 soit 13,9 g par molécule de Glycocolle.

La quantité de Glycocolle sera :

$$x = \frac{0,104 \times 75}{13,9} = 0,56 \text{ g/100 ml}$$

Les pourcentages d'azote dosés varient de 97 p 100 jusqu'à 17 p 100 selon l'acide aminé. Ainsi, mis à part la sérine, aucun acide aminé n'est dosé intégralement. Nous avons essayé de grouper ces composés selon leurs points communs (poids moléculaire, nombre de fonctions aminées, aromatiques), mais nous constatons qu'il n'y a pas de relations entre leurs caractéristiques chimiques et le pourcentage d'azote dosé.

L'étude analytique de la méthode de Goiffon et Nepveux a permis de mettre en évidence certaines causes d'erreurs correspondant à la méthode elle-même dans la mesure où les solutions pures testées présentent des concentrations en azote équivalentes à celles des dilutions fécales. En effet, l'utilisation de la phénol phtaléine, dont le virage de l'incolore au rose pâle se produit à un pH trop bas, est responsable du dosage partiel mais global de l'ammoniaque, des acides aminés et des amines. On peut espérer améliorer la technique :

- soit en conservant la phénol phtaléine, mais en codifiant son virage dans une zone de pH où le dosage intéresserait la quasi totalité des dérivés azotés ;

- soit en choisissant un indicateur subissant un changement de couleur facilement repérable à un pH élevé.

Quant au caractère global du dosage, la participation des trois groupes de composés concernés est différente tant du point de vue analytique que du point de vue pathologique. L'isolement de l'ammoniaque semble être souhaitable pour apprécier le degré des putréfactions. On peut espérer pouvoir le réaliser en faisant appel à des résines échangeuses d'ions.

- III -

ESSAIS DE MODIFICATIONS DE LA METHODE DE GOIFFON ET NEPVEUX

Les conclusions précédentes nous conduisent à étudier trois modifications :

- virage de la phénol phtaléine à un pH élevé ;
- choix d'un nouvel indicateur de pH ;
- fractionnement par les résines échangeuses d'ions.

A - *VIRAGE DE LA PHENOL PHTALEINE*

1) Principe :

Le début du virage de la phénol phtaléine de l'incolore au rose pâle est aisément perceptible, mais se situe à un pH trop bas (8,2) pour lequel les différents composés azotés ne sont que partiellement dosés, tout au moins dans les conditions de concentrations caractéristiques du milieu biologique envisagé. Toutefois la teinte de cet indicateur coloré se transforme progressivement jusqu'à pH = 10 ; on peut donc essayer de l'utiliser dans des conditions d'alcalinisation pour lesquels la dissociation des dérivés azotés recherchés serait aussi complète que possible.

2) *Technique :*

Vingt millilitres d'une solution des dérivés azotés neutralisée et traitée par le formol, comme il a été indiqué précédemment (voir chapitre I), sont additionnés de soude N/10 jusqu'à obtention d'une coloration rouge foncé qu'un volume de soude supplémentaire est incapable de modifier.

3) *Résultats :*

Tandis que l'apparition de la teinte rose pâle est très facile à percevoir, il est au contraire très difficile de repérer le terme du virage au rouge vif de sorte que les résultats sont difficilement reproductibles, ceci explique les précautions prises par SORENSEN. Nous avons insisté, mais elles sont telles qu'elles compliquent considérablement la technique.

Avec d'énormes difficultés d'interprétation et en multipliant les analyses, nous avons essayé de doser un certain nombre de dérivés azotés. Nos résultats moyens figurent dans le tableau n°VI. On peut y lire les pourcentages d'azote dosé.

TABLEAU VI

Dosage de solutions pures en retardant le virage de la phénol phtaléine jusqu'à coloration rouge foncé

Solutions	*Concentration g/100 ml*	*Soude N/10 pour 20 ml*	*p 100 N dosé*
Chlorure d' ammonium	0,5	19,6	104
Leucine	1	16,4	110
Glycocolle	0,56	15,7	105
Cadavérine	0,34	15	103

4) *Comparaison des résultats en fonction de la teinte prise par la phénol phtaléine :*

Dans le tableau VII (page suivante), nous comparons la quantité d'azote dosée en prenant pour terme du dosage d'une part l'apparition

d'une teinte rose pâle et d'autre part la coloration rouge vif.

TABLEAU VII

Comparaison des taux d'azote dosé dans des solutions pures en prenant pour terme de dosage les colorations roses et rouges

Solutions	*p 100 N dosé terme du dosage : ROSE*	*p 100 N dosé terme du dosage : ROUGE*
$Cl\ NH_4$ à 0,5 %	100	104
Leucine à 1 %	42	110
Glycocolle à 0,56 %	91	105
Cadavérine à 0,34 %	95	103

Les résultats correspondant aux dosages dont la limite est fixée lors que la couleur rouge vif est à son maximum sont théoriquement satisfaisants, mais en pratique ils ne sont pas reproductibles étant donné la quasi impossibilité d'arrêter le virage à la nuance souhaitée.

Aussi, avons-nous orienté nos recherches en changeant d'indicateur de pH. L'idéal serait de trouver un réactif qui présente un virage net de coloration à un pH voisin de 9.

B - CHOIX D'UN NOUVEL INDICATEUR

Pour être significative, la méthode de Goiffon et Nepveux, que nous essayons de modifier, doit comporter deux étapes :

- neutralisation à pH voisin de 8,
- dosage à pH voisin de 9.

Le choix d'un indicateur coloré découle de ces conditions. Nous avons envisagé trois combinaisons possibles :

- Phénol phtaléine - Rouge crésol,
- Phénol phtaléine - phtaléine du thymol,
- Thymol phtaléine - Rouge neutre.

1) Phénol phtaléine - Rouge crésol :

L'inconvénient de la phénol phtaléine se situe au niveau du dosage où son virage est trop progressif au pH utile. En l'associant à un indicateur dont le virage est plus net, on peut penser se placer dans une zone intéressante et plus facilement appréciable. Dans ce sens,nous avons choisi l'association phénol phtaléine - rouge crésol.

a) Réactifs :

- Phénol phtaléine en solution alcoolique à 2 p 1000 vire de l'incolore au rose à pH = 8,3, puis au rouge à pH = 10.

- Rouge crésol en solution aqueuse (saturée) : vire du jaune à l'orangé à pH = 7,2 puis au rouge à pH = 8,8.

b) Technique :

A une solution de chlorure d'ammonium à 0,5 p 100, nous ajoutons quelques gouttes de phénol phtaléine et nous alcalinisons jusqu'à teinte légèrement rose (pH = 8,2).

D'autre part, nous prenons du formol à 40 p 100 au demi, que nous neutralisons en présence de phénol phtaléine.

Nous mélangeons alors 10 ml de formol neutralisé à 20 ml de la solution de chlorure d'ammonium à 0,5 p 100. La coloration rose disparaît. Nous ajoutons alors quelques gouttes de rouge crésol et nous dosons par de la soude N/10.

c) Résultats :

Cette association de réactifs colorés ne nous a pas paru satisfaisante, car, avant d'arriver à pH = 8,8, qui donne la teinte rouge au crésol, il y a superposition du rose de la phénol phtaléine et de l'orangé du crésol. Par conséquent, le virage du rouge crésol est difficile à repérer, car il est masqué par la phénol phtaléine. A un pH supérieur, la coloration s'intensifie sans possibilité de fixer un terme précis. Cette association n'est donc pas valable (graphique II, page 36).

2) Phénol phtaléine - thymol phtaléine :

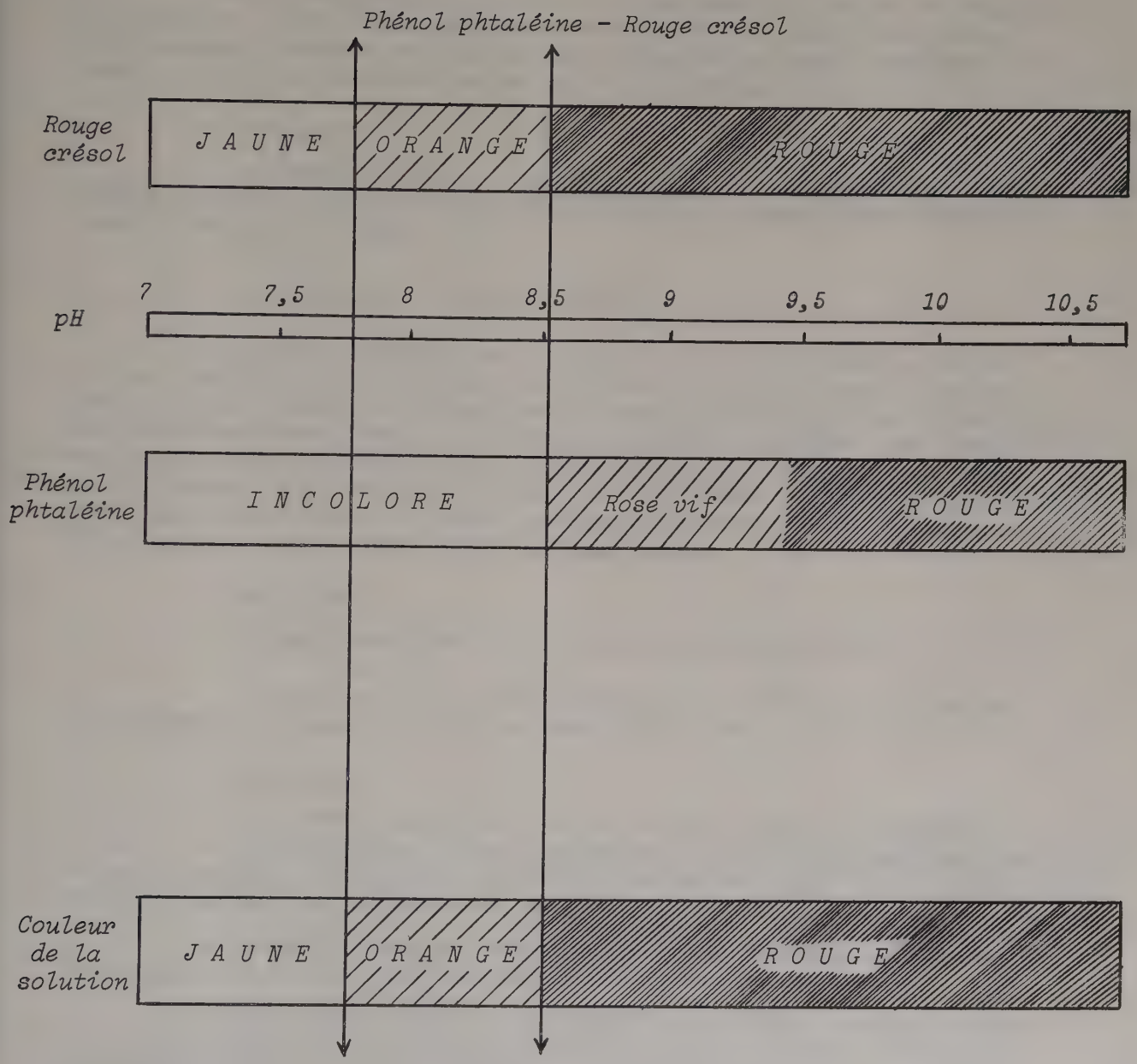
Le thymol phtaléine présentant un virage à un pH élevé est un réactif possible de dosage ; pour la neutralisation, nous lui assoçions la phénol phtaléine.

a) Réactifs :

- Phénol phtaléine en solution alcoolique au 1/2000e : vire de l'incolore au rose à pH = 8,3, puis au rouge à pH = 10.

Graphique n°II

Zones de virage



- Thymol phtaléine en solution alcoolique à 2 p 100 vire de l'incolore au bleu à pH = 9,3 ; la teinte bleue s'intensifie progressivement jusqu'à pH = 10,5.

b) Technique :

Comme précédemment, les neutralisations de la solution, ainsi que celle du formol, sont réalisées avec la phénol phtaléine. Après avoir mélangé les deux solutions, nous ajoutons la thymol phtaléine et nous poursuivons l'alcalinisation en vue du dosage.

c) Résultats :

La solution passe de l'incolore au violet foncé,mais le changement est trop progressif pour que le terme du dosage puisse être précisé (graphique III, page 38).

3) Thymol phtaléine - Rouge neutre :

La thymol phtaléine est un réactif très intéressant pour le dosage, car elle vire nettement au bleu à pH = 9,3. Mais il est nécessaire de lui associer un autre réactif pour la neutralisation préalable des solutions. Nous venons de voir que la phénol phtaléine est inutilisable parce que sa couleur trop intense masque le changement de teinte de la thymol phtaléine. Il convient donc de trouver un colorant qui soit pâle au pH pour lequel la thymol phtaléine passe de l'incolore au bleu. C'est pourquoi nous avons pensé au rouge neutre.

a) Réactifs :

- Thymol phtaléine à 1 p 100 dans l'alcool à 95°.

- Rouge neutre à 2 p 100 dans l'alcool à 50 p 100 vire progressivement du rouge à pH 6,8 au jaune pâle à pH 8.

b) Technique :

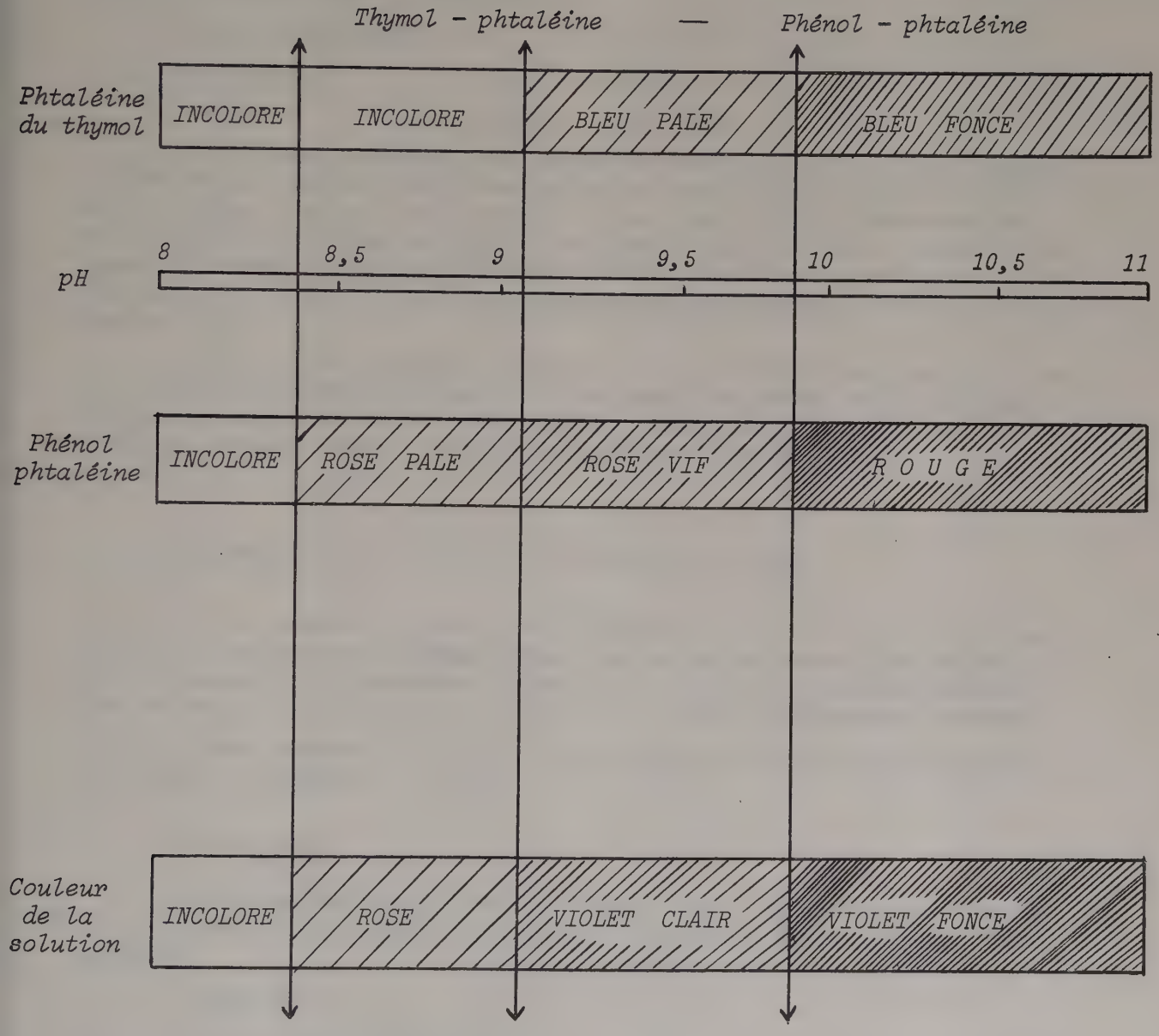
L'essai est effectué sur une solution de chlorure d'ammonium à 0,5 p 100 (prise d'essai 20 ml). Après avoir ajouté quelques gouttes de rouge neutre, nous amenons le pH à 8 avec de la soude N/10 ; la coloration de la solution passe du rouge au jaune pâle.

La neutralisation du formol est faite en présence de rouge neutre jusqu'à obtention d'une coloration jaune.

Le formol neutralisé est mélangé à la solution neutre de chlorure d'ammonium à 0,5 p 100 qui redevient rouge. Quelques gouttes de thymol phtaléine sont alors ajoutées (la thymol phtaléine est incolore à ce pH) et nous dosons avec de la soude N/10.

Graphique n°III

Zones de virage



c) Résultats :

Théoriquement il faut 18,7 ml de soude N/10 pour doser 20 ml d'une solution de chlorure d'ammonium à 0,5 p 100.

Les volumes de soude N/10 versés en s'arrêtant à chaque étape de la coloration sont les suivantes :

- pelure d'oignon 0 --- 17,8 ml
- jaune 17,8 --- 18,5 ml
- bleu 18,5 --- 19,9 ml.

Le terme du virage correspond donc à l'apparition d'une légère teinte bleu. Dans les conditions de notre expérience, il est difficile de la repérer ; ceci tient peut-être à une trop faible concentration de la thymol phtaléine par rapport au rouge neutre ; d'où l'étude d'une nouvelle formule comportant plus de thymol phtaléine (solution à 2 p 100 au lieu de 1 p 100) et moins de rouge neutre (solution à 1 p 100 au lieu de 2 p 100).

Cette association de réactifs à ces concentrations est plus valable que les précédentes mais il n'en reste pas moins qu'il est très délicat d'apprécier le terme du dosage, c'est-à-dire le moment où la solution jaune se teinte de bleu (graphique IV, page 40).

C - FRACTIONNEMENT PAR LES RESINES ECHANGEUSES D'IONS

Les résultats fournis par la méthode de Goiffon et Nepveux représentent globalement l'ammoniaque, les amines et les acides aminés. Or l'isolement de l'ammoniaque comme seul composé à doser nous paraît être souhaitable pour les raisons que nous avons précédemment exposées.

Pour essayer d'effectuer cette séparation nous nous adressons aux résines échangeuses d'ions.

1) Principe :

Le principe d'utilisation de ces résines est fondé sur l'échange d'ions entre une particule insoluble ionisée et une solution d'électrolytes.

Exemple :

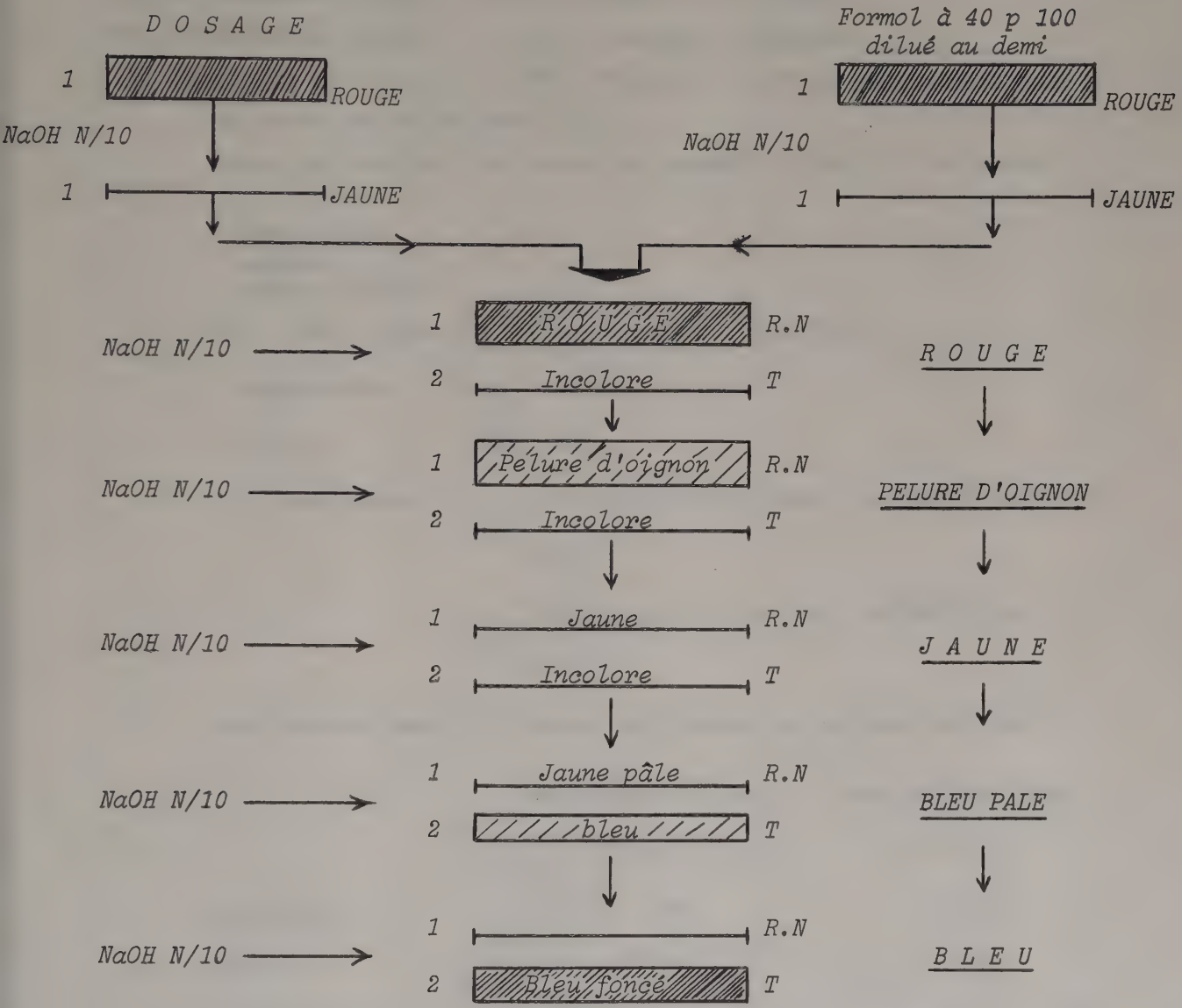
$$(R)_{\text{résine}} - H^+ + NH_4^+ HO^- \rightleftharpoons (R)_{\text{résine}} - NH_4^+ + H^+ - OH^-$$

$$(R)_{\text{résine}} - HO^- + Na^+ Cl^- \rightleftharpoons (R) - Cl^- + Na^+ HO^-$$

Graphique n° IV

Dosage avec l'association { Rouge Neutre / Thymol phtaléine

Rf coloré - 1 R. neutre - 2 Thymol phtaléine



Ces résines peuvent être classées en quatre catégories selon le groupement échangeur fixé sur une structure hydrocarbonée inerte qui en constitue la matière de base.

- COOH (faiblement acide) : faible échanteur de cations ;
- SO_3 H (fortement acide) : fort échangeur de cations ;
- NX_3 (faiblement basique) : faible échangeur d'anions ;
- NX_3 OH (fortement basique) : fort échangeur d'anions.

(X = groupement aliphatique).

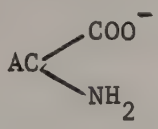
Notre but est de fractionner un ensemble formé de trois constituants :

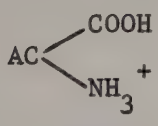
- ammoniaque,
- amines,
- acides aminés.

Sous leurs formes ionisées, on peut les écrire :

ammoniaque : $NH_4^+ \quad HO^-$

amines : $NH_3^+ \quad AC$

acides aminés :  (pH > au point isoélectrique)

 (pH < au point isoélectrique)

Leur comportement à l'égard des résines se schématise ainsi :

	Résine cationique	Résine anionique
	$R - H^+$	$R - HO^-$
ammoniaque	$R - NH_4^+$	$R - HO^-$
amines	$R - Ac - NH_3^+$	$R - HO^-$
acides aminés	$R - COOH - Ac - NH_3^+$	$R - NH_2 - Ac - COO^-$

Ainsi les résines cationiques sont susceptibles de fixer tous les dérivés aminés tandis que les résines anioniques ne retiennent que les acides aminés.

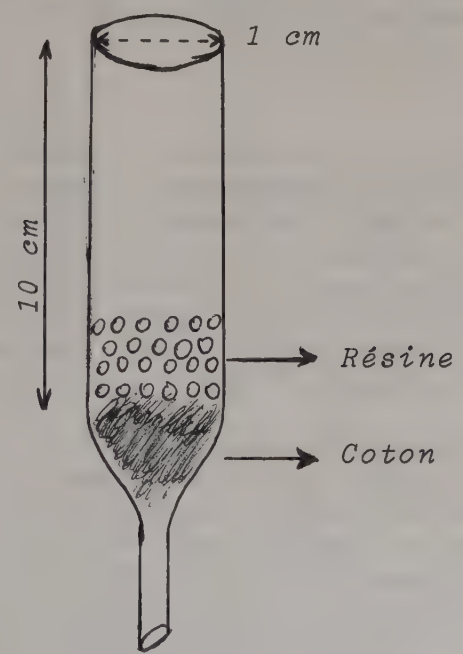
En théorie, seules ces dernières présentent pour nous un intérêt, car elles doivent permettre séparément le dosage de l'ammoniaque et des amines, celles-ci pouvant représenter un élément de putréfaction assimilable à l'ammoniaque. En fait, les capacités d'échanges des résines sont fonction de leur structure et du degré de dissociation des composés soumis au fractionnement. Pour cette raison, nous avons testé expérimentalement :

- une résine cationique : la Dowex 50 × 8 H^+ fortement acide,
- des résines anioniques :
  - . Amberlite IR 45/OH/AG, faiblement basique ;
  - . Dowex 2 × 8 20/50 Cl^-, fortement basique ;
  - . Bio-Rex AG 1 × 2 200-400 CH_3COO^- fortement basique.

Afin de connaître les composés retenus en pratique par ces différentes résines, nous avons traité celles-ci par des solutions d'ammoniaque, d'acides aminés et d'amines préalablement agitées avec de la chaux, afin de nous placer dans les conditions de l'analyse des dilutions fécales.

2) *Technique :*

a) Préparation de la colonne :



Plusieurs tubes de verre de 1 cm de diamètre interne sont étirés en colonnes de 10 cm de hauteur. A l'intérieur de chacune d'elles, un petit tampon de coton est placé dans la région infundibulaire. La résine est alors introduite sur une hauteur d'à peu près 4 cm. Pour effectuer des dosages en série, chaque colonne est placée au-dessus d'une éprouvette graduée sur laquelle elle est maintenue à l'aide d'un support en mousse (voir schéma page 44). Il est ainsi facile de traiter simultanément plusieurs solutions.

b) Traitement par la chaux :

Toutes les solutions de sels d'ammonium, d'acides aminés et d'amines que nous avons testées sont préalablement traitées par un excès de chaux, de façon à nous placer dans les mêmes conditions d'alcalinité que celles permettant la défécation des dilutions fécales. Une filtration est réalisée ensuite.

c) Dosage :

Vingt millilitres de filtrat de chaque solution sont alors dosés selon la méthode de Goiffon et Nepveux en prenant pour terme du dosage l'apparition de la teinte rose.

Le reste du filtrat est alors passé sur résine et le même dosage est ensuite effectué sur 20 ml.

En comparant les deux résultats, nous pouvons apprécier le pourcentage de substances retenu par chaque résine.

3) Résultats :

Comme nous l'avons vu précédemment, les résines cationiques doivent théoriquement retenir l'ammoniaque, les amines et les acides aminés. La Dowex 50 × 8 H^+ qui appartient à cette catégorie retient effectivement ces différents composés en presque totalité, mais dans des proportions variables (tableau VIII, page 45) tout au moins dans les conditions où nous nous sommes placé et avec les dérivés azotés auxquels nos essais se sont limités. Donc comme la théorie le laissait prévoir, cette résine ne présente pas d'intérêt pour nous.

Les résines anioniques (tableau IX, page 45) doivent théoriquement laisser passer l'ammoniaque et les amines et ne retenir que les acides aminés. Pour l'ammoniaque, on peut considérer que la théorie est vérifiée avec les trois résines étudiées. En ce qui concerne les amines, l'Amberlite et la Dowex 2 × 8 les fixent irrégulièrement dans des proportions trop importantes. Quant au glycocolle et à la leucine que nous avons choisis comme type d'amino-acides, ils ne sont qu'en partie retenus par ces deux résines contrairement à ce qui est prévisible.

Passage sur colonne des solutions

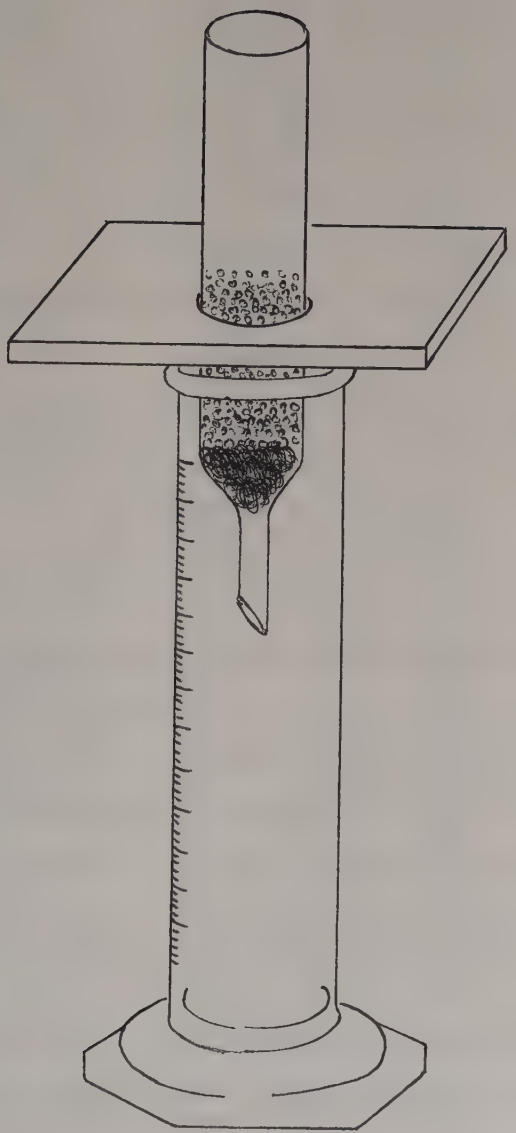


TABLEAU VIII

Résine échangeuse de cations

Dowex 50 × 8 H^+ p 100 de rétention

Solutions (g/100 ml)		*p 100 de rétention*
Cl NH_4	0,5	95,2
Ethanolamine	0,46	94
Cadavérine	0,38	29
Tyramine	1,3	85
Glycocolle	0,56	84
Leucine	1	91
Alanine	0,67	95,9

TABLEAU IX

Résines échangeuses d'anions p 100 de fixation

Solutions (g/100 ml)		*Amberlite IR 45/OH/AG*	*Dowex 2 × 8 20/50 Cl*	*Bio-Rex AG 1 × 2 acétate*
SO_4 $(NH_4)_2$	0,5	11	0	3
Ethanolamine	0,46	28	0	7
Putrescine	0,33	44	43	6
Cadavérine	0,38	56	14	9
Histamine	1,4	50	0	3
Tyramine	1,3	36	11	100
Glycocolle	0,56	71	38	100
Leucine	1	14	13	100

Les résultats donnés par l'Amberlite et la Dowex sont donc beaucoup trop anarchiques pour pouvoir être utilisés.

A l'opposé, la résine Bio-Rex nous paraît intéressante,puisqu'elle se comporte conformément à la théorie. Aussi avons-nous poursuivi les essais afin de la tester sur un maximum de dérivés (voir tableau X)

TABLEAU X

Bio-Rex AG 1 × 2 acétate

Solutions en g/100 ml		*N mg/100 ml avant résine*	*N mg/100 ml après résine*	*Rétention p 100*
Cl N H_4	0,5	117,6	114,8	3
Cadavérine	0,34	95,2	86,8	9
Ethanolamine	0,46	99,4	92,4	7
Putrescine	0,33	99,4	93,8	6
Histamine	1,4	65,8	64,4	3
Phényléthylamine	0,92	114,8	114,8	0
Tyramine	1,3	131,6	nul	100
Taurine	0,94	96,6	nul	100
Alanine	0,67	56	nul	100
Glycocolle	0,56	95,2	nul	100
Leucine	1	61,6	nul	100
Histidine	1,3	40,6	nul	100
Sérine	0,79	127,4	nul	100
Cystéine	1,3	57,4	nul	100
Tryptophanne	1,5	35	nul	100
Lysine	1,1	113,4	7	99,4
Arginine	0,56	35	21	40

- l'ammoniaque n'est pas retenue;

- les amines ne le sont pas davantage à l'exception de la Taurine (- SO_3 H) et la Tyramine (oxydryle phénolique), qui se comportent comme des acides forts et sont ainsi assimilables aux acides aminés dont la rétention est totale. Nous avons donc affaire à une résine tout à fait valable permettant d'éliminer les acides aminés et de ne conserver que l'ammoniaque et les amines.

C'est donc une solution qui peut être retenue. Cependant les difficultés pratiques qu'elle entraîne et l'absence d'un isolement complet de l'ammoniaque nous ont conduit à envisager d'autres moyens.

TROISIEME PARTIE

Dosage spécifique de l'ammoniaque

-:-

Devant l'échec partiel du dosage séparé de l'ammoniaque, nous avons essayé d'appliquer à l'analyse des dilutions fécales une réaction quantitative spécifique et sensible de l'ammoniaque en présence de dérivés azotés.

Notre choix s'est plus particulièrement orienté sur la réaction colorée mise au point par BERTHELOT (1859) : l'ammoniaque en présence de phénol et d'hypochlorite de sodium en milieu alcalin donne une coloration bleue.

De nombreux auteurs ont essayé de l'adapter à l'analyse biologique et de la rendre quantitative. Parmi eux, LUBOCHINSKY et ZALTA (1954) semblent avoir obtenu les meilleurs résultats.

C'est donc leur technique que nous avons adoptée tout en lui apportant quelques modifications pour pouvoir l'appliquer à l'analyse fécale.

-:-

- I -

METHODE DE LUBOCHINSKY ET ZALTA

A - *PRINCIPE*

LUBOCHINSKY et ZALTA modifient la réaction de BERTHELOT pour la rendre quantitative et reproductible en la catalysant par du nitroprussiate de sodium et en établissant le pH optimum ainsi que les proportions les meilleures entre le phénol et l'hypochlorite alcalin.

B - *REACTIFS*

1) *Solution de phénate de sodium :*

Phénol	4,3 ml
Soude N	62,5 ml
Eau distillée q.s.p.	100 ml

2) *Solution tampon phosphate : pH 12 :*

Solution aqueuse de phosphate disodique ($12\ H_2O$) à 3,58 p 100	50 ml
Soude N	6,65 ml
Eau distillée q.s.p.	200 ml

3) *Solution aqueuse de rouge de méthyle à 0,25 p 1000 :*

Dans un mortier en verre, triturer 0,1 g de rouge de méthyle avec 7,4 ml de soude N/20. Compléter à 25 ml avec de l'eau distillée. Pour obtenir une concentration de 0,25 p 1000 diluer 1 ml de cette solution dans 15 ml d'eau distillée.

Nous n'emploierons pas ce réactif utilisé dans la méthode décrite par LUBOCHINSKY et ZALTA, étant donné que nous avons affaire à des solutions neutres ou alcalines.

4) *Solution de nitroprussiate de sodium à 1 pour 2000 :*

préparée extemporanément à partir d'une solution aqueuse à 1 p 100.

5) *Solution d'hypochlorite de sodium à 4° chlorométrique :*

fraîchement préparée à partir d'une solution commerciale d'hypochlorite à 20° chlorométriques.

C - TECHNIQUE

0,5 ml d'une solution d'un sel d'ammonium correspondant à une quantité d'azote de 0,5 à 10 µg, sont introduits dans une éprouvette graduée de 20 ml.

Nous versons alors :

- 2 ml de phénate de sodium,
- 2 ml de tampon phosphate,
- 2 ml de nitroprussiate de sodium,
- 0,5 ml d'hypochlorite de sodium.

Après agitation, on complète à 20 ml avec de l'eau distillée. La coloration bleue se développe à l'obscurité en 30 minutes au maximum, même à zéro degré ; elle est stable 24 heures. La lecture s'effectue à 6100 nm.

- II -

ETUDE ANALYTIQUE
DE LA METHODE DE LUBOCHINSKY ET ZALTA

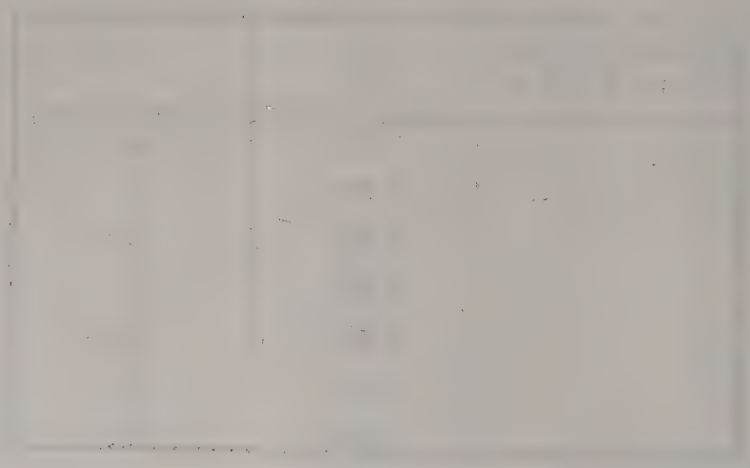
A - *INFLUENCE DE LA LONGUEUR D'ONDE*

Afin de déterminer la meilleure longueur d'onde possible pour cette réaction, nous avons, selon la technique précédente, testé une solution de chlorure d'ammonium contenant 6,6 µg d'azote dans 0,5 ml.Nous avons mesuré la densité optique à différentes longueurs d'ondes comprises entre 5950 et 6500 nm (tableau XI).

TABLEAU XI

Recherche de la meilleure longueur d'onde sur une solution de Cl NH_4 contenant 6,6 µg d'azote/0,5 ml

Solution Cl NH_4 6,6 µg N/0,5 ml	λ	*Do*
	5 959	43
	6 000	43
	6 100	44
	6 200	42
	6 300	41,5
	6 400	41
	6 500	41



La densité optique la plus élevée correspond à 6 100 nm comme l'indiquent LUBOCHINSKY et ZALTA.

B - INFLUENCE DU TEMPS SUR L'EVOLUTION DE LA COLORATION

Nous opérons comme précédemment sur une solution de chlorure d'ammonium contenant 6,6 µg d'azote dans la prise d'essai (0,5 ml).Après avoir versé tous les réactifs et complété à 20 ml avec de l'eau distillée, nous faisons la lecture au spectrophotomètre, à 6 100 nm, à des intervalles de temps réguliers (voir tableau ci-dessous).

Temps	*Do*
0	43,5
5 minutes	42,5
10 minutes	43
15 minutes	43
20 minutes	44
25 minutes	44
30 minutes	44
40 minutes	44
60 minutes	44
2 heures	44
4 heures	44
8 heures	44
24 heures	44

Ce tableau montre que la densité optique maximum est atteinte au bout de 20 minutes et reste stable 24 heures. Par conséquent, nous avons admis que la lecture pouvait être faite après 30 minutes avec un maximum de sécurité.

C - CARACTERE QUANTITATIF

Nous partons d'une solution de sulfate d'ammonium à 0,5 g pour 100 ml correspondant à une concentration en azote de 530 µg dans 0,5 ml (volume de la prise d'essai).

Nous préparons une série de six dilutions dont les titres figurent au tableau XII. Nous soumettons 0,5 ml de chacune d'elles à la réaction de Lubochinsky et Zalta en utilisant les réactifs selon les proportions déjà indiquées et en faisant la lecture à 6 100 nm après 30 mn de développement en utilisant un spectrophotomètre Jean et Constant avec des cuves de 10 millimètres.

TABLEAU XII

Etablissement de la courbe avec $SO_4 (NH_4)_2$

$SO_4 (NH_4)_2$ *en mg pour 100 ml*	*Azote en mg pour 100 ml*	D^u	*Azote en g pour 0,5 ml*
500	106	Illisible	530
20	4,2	69 *	21
10	2,1	68,5	10,5
6,6	1,4	46	7
5	1,05	34,5	5,25
3,3	0,7	23	3,5
2,5	0,525	16,5	2,6

* *Après dilution au demi.*

La relation qui unit les densités optiques aux différentes concentrations en azote se traduit par une droite (voir graphique V, page 55).

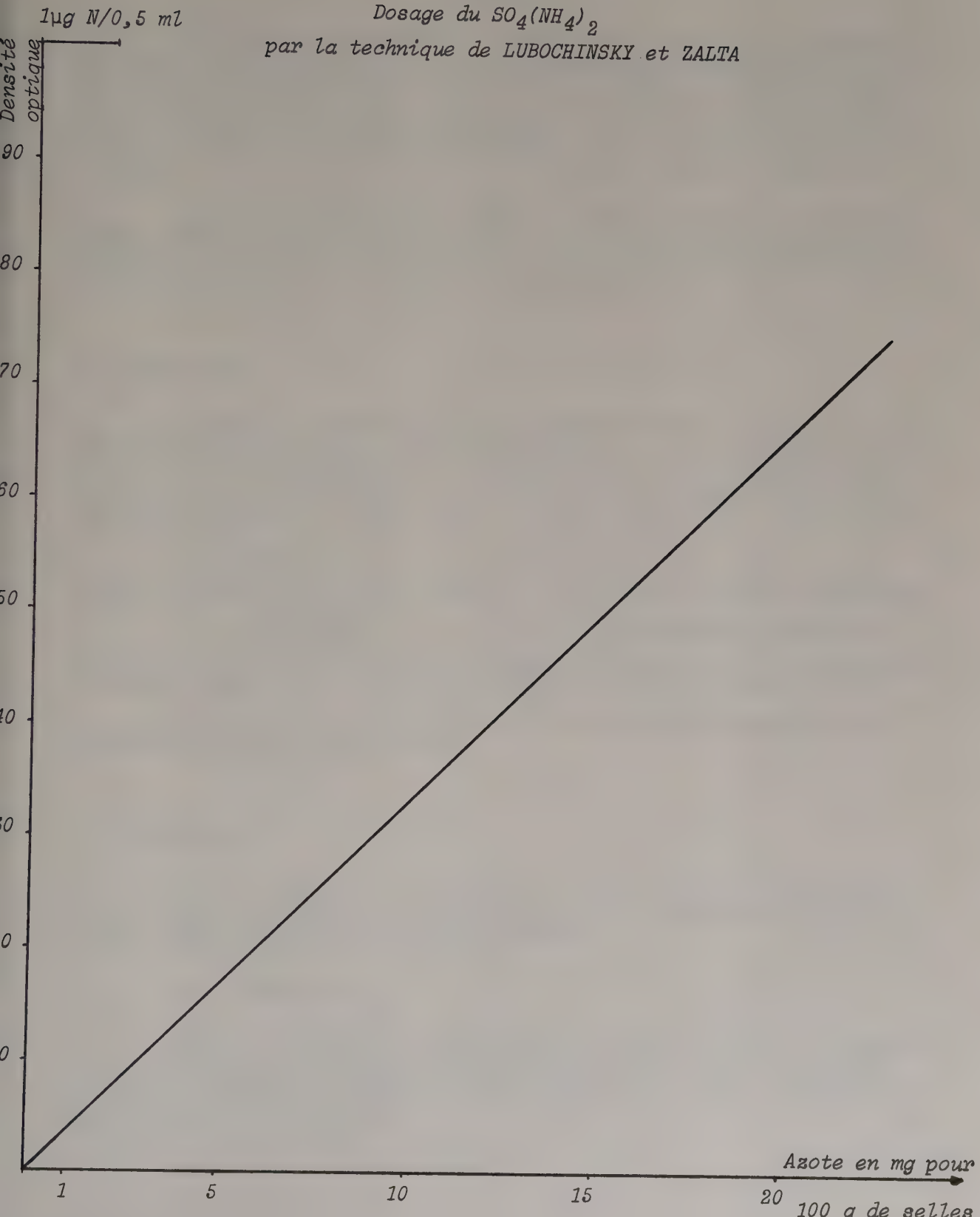
La réaction de Lubochinsky et Zalta est donc quantitative pour des valeurs d'azote ne dépassant pas 12,2 µg dans la prise d'essai (0,5 ml).

Lorsque nous avons affaire à une solution dont la concentration en azote est supérieure à 12,2 µg/0,5 ml, c'est-à-dire lorsque la coloration est trop intense pour être lisible, LUBOCHINSKY et ZALTA recommandent de diluer avec le blanc témoin alors que la couleur s'est développée.

En opérant ainsi avec une solution de sulfate d'ammonium à 21 µg d'azote/0,5 ml que l'on dilue au 1/3 une fois la réaction accomplie, la densité optique est de *32*. En nous reportant à la droite précédemment établie, cette valeur correspond à 4,8 µg d'azote soit 4,8 × 3 = 14,4 µg d'azote dans la solution initiale au lieu de 21 µg.

GRAPHIQUE V

Dosage du $SO_4(NH_4)_2$
par la technique de LUBOCHINSKY et ZALTA



Nous avons donc essayé de savoir s'il ne serait pas préférable de diluer la solution avec de l'eau distillée avant de commencer la réaction colorée. Nous avons opéré de cette façon sur la même solution que précédemment c'est-à-dire contenant 21 µg d'azote dans 0,5 ml en la diluant au 1/3. La densité optique obtenue est alors de *46*. Ce qui correspond à 7 µg d'azote soit 7 × 3 = 21 µg d'azote dans la solution de départ.

Il est donc préférable, comme le montre cet essai, et nous en tenons compte par la suite, de diluer les solutions trop riches en azote avant de commencer la réaction colorée plutôt que d'effectuer cette dilution alors que la coloration s'est développée.

D - SENSIBILITE

D'après les résultats que nous avons établis et selon la droite que nous avons pu tracer, nous savons que la plus petite quantité de sel d'ammonium titrable est 1 µg d'azote dans 0,5 ml. En effet, cette notion de sensibilité présente pour nous un grand intérêt car elle est une des conditions de l'application de cette réaction aux analyses fécales.

En principe, 100 g de selles renferment normalement un taux d'azote ammoniacal de l'ordre de 30 mg. La quantité de selles correspondante est de : $\frac{100 \times 1,25}{30\ 000} = 4,2$ mg, ce qui est donné par une dilution à 1 p 1000. La sensibilité de la réaction de Lubochinsky et Zalta pouvant descendre jusqu'à 1 à 1,25 µg d'azote dans la prise d'essai de 0,5 ml.

Cette méthode paraît donc tout à fait satisfaisante pour son application aux analyses fécales.

E - SPECIFICITE

Afin de préciser la spécificité de la réaction de Lubochinsky-Zalta, nous la testons successivement sur les sels ammoniacaux, les acides aminés, les amines et divers dérivés.

1) Sel d'ammonium :

Dans cet essai, nous voulons savoir si nous obtenons les mêmes résultats par cette réaction colorée, quelque soit le sel d'ammonium considéré. La droite de référence est tracée avec le sulfate d'ammonium exprimé en µg d'azote/0,5 ml.

Nous faisons la réaction avec une solution de chlorure d'ammonium aux concentrations respectives de 65, 9,1, 6,6 µg et 3,3 µg d'azote/0,5 ml, la prise d'essai étant de 0,5 ml nous ajoutons :

- 2 ml de phénate de sodium,
- 2 ml de tampon phosphate,
- 2 ml de nitroprussiate de sodium,
- 0,5 ml d'hypochlorite de sodium.

On complète à 20 ml avec de l'eau distillée ; après une demi heure à l'obscurité et lecture à 6 100 nm, nous traduisons les densités optiques en µg d'azote pour 0,5 ml à l'aide de la droite correspondant au sulfate d'ammonium (voir tableau XIII, ci-dessous). Nous retrouvons la totalité de l'azote des prises d'essai.

Ainsi les résultats dépendent exclusivement de la quantité d'azote.

TABLEAU XIII

Solution de chlorure d'ammonium

Concentration g/100 ml	*Teneur en N µg/0,5 ml*	*Do*	*Azote dosé µg/0,5 ml*	*p 100 Azote dosé*
0,05	65	84 *	64	98
0,007	9,1	61	9,1	100
0,005	6,6	44	6,6	100
0,0025	3,3	22	3,3	100

* *Après dilution au tiers.*

2) *Amines* :

La réaction de Lubochinsky et Zalta est faite sur 0,5 ml de sept solutions d'amines dont la teneur en azote est de 1 mg/ml. La technique est identique à la précédente.

Le tableau XIV montre qu'aucun de ces composés ne donne la réaction.

(voir tableau XIV, page suivante).

TABLEAU XIV

Dosage des amines par la méthode de Lubochinsky et Zalta

Solutions d'amines	*Concentration g/100 ml*	*Teneur en azote g/0,5 ml*	*Do*	*Quantité d'azote dosé g/0,5 ml*	*p 100 d'azote dosé*
Ethanolamine	0,46	505	33	5	0,99
Cadavérine	0,34	459	27	4,15	0,9
Putrescine	0,33	528	18,5	2,85	0,53
Taurine	0,94	520	20	3,1	0,5
Histamine	1,4	462	12	1,85	0,4
Phényl-éthylamine	0,92	505	2	0,3	0,05
Tyramine	1,3	520	0	0	0

3) *Acides aminés :*

Différents acides aminés en solution de titre déterminé correspondant approximativement à 1 mg d'azote/ml sont soumis à la réaction de Lubochinsky et Zalta afin de savoir s'ils sont dosés.

On opère sur 0,5 ml comme précédemment.

Le tableau XV (page 59) montre que, sur dix solutions d'acides aminés essayés, seuls le glucocolle et l'alanine donnent une très faible réaction qui peut être considérée comme négligeable. Par conséquent, les acides aminés n'interviennent pas dans la réaction.

4) *Composés divers :*

Les composés auxquels nous nous sommes adressés sont susceptibles d'être rencontrés dans les selles et leur interférence est donc à craindre :

- sang,
- chlorophylle,
- sels biliaires,
- acides organiques,
- dérivés phénoliques.

(voir tableau XVI, page 60).

TABLEAU XV

Dosage de Lubochinsky et Zalta de solutions d'acides aminés

Solutions d'acides aminés	*Concentration (g/100 ml)*	*Teneur en azote (g/0,5 ml)*	*Do*	*Quantité d'azote dosé (g/0,5 ml)*	*p 100 d'azote dosé*
Glycocolle	0,56	520	38 *	17,4	3,3
Alanine	0,67	520	33,5 *	15,3	2,9
Arginine	0,56	180	16	2,5	1,3
Leucine	1	530	19	2,9	0,5
Lysine	0,55	520	3	0,5	0,09
Histidine	1,3	585	0	0	0
Sérine	0,79	510	0	0	0
Cystéine	1,3	520	0	0	0
Tryptophanne	1,5	510	0	0	0
Tyrosine	1,3	500	0	0	0

* *Après dilution au 1/3.*

TABLEAU XVI

Réaction de Lubochinsky et Zalta sur différents produits

Produits essayés	*Réaction négative*	*Réaction faiblement positive*	*Réaction positive*
Bilirubine	+		
Ac. urique	+		
Créatinine	+		
Cholestérol	+		
Sels biliaires	+		
Chlorophyle	+		
Sang	+		
Levure de bière	+		
A C I D E S			
Ac. succinique	+		
Ac. fumarique		+	
Ac. lactique	+		
Ac. valérianique	+		
Ac. malique	+		
DERIVES DU PHENOL			
Phénol	+		
Indol	+		
Pyrocatéchine	+		
Résorcine	+		
Hydroquinone	+		
Pyrrogallol	+		

Nous avons effectué la réaction colorée sur 0,5 ml de chaque composé mis en solution. La tableau montre qu'aucun de ces corps ne fournit la réaction.

TABLEAU XVII

Essais de conservation des réactifs

Tube n°	REACTIFS FRAIS				REACTIFS CONSERVES				
	Phénate de sodium	Tampon phosphate	Nitroprussiate de sodium	Hypochlorite de sodium	Phénate de sodium	Tampon phosphate	Nitroprussiate de sodium	Hypochlorite de sodium	Do
1	+	+	+	+					44
2		+	+	+	⊕				32,5
3	+		+	+		⊕			41
4	+	+		+			⊕		42
5	+	+	+					⊕	43

F - CONSERVATION DES REACTIFS

Dans cet essai, nous recherchons si un réactif est susceptible de fausser les résultats par sa mauvaise conservation. Dans ce but, nous avons gardé pendant trois semaines à la température du laboratoire et à la lumière naturelle ou artificielle les quatre réactifs de Lubochinsky et Zalta.

Nous soumettons une solution de chlorure d'ammonium renfermant 6,6 µg d'azote dans 0,5 ml à cinq combinaisons, qui diffèrent entre elles par la conservation d'un seul réactif, les autres étant fraîchement préparés :

- tube 1 : tous les réactifs sont frais,
- tube 2 : tous les réactifs sont frais, sauf le phénate de sodium,
- tube 3 : tous les réactifs sont frais, sauf le tampon phosphate,
- tube 4 : tous les réactifs sont frais, sauf le nitroprussiate de sodium,
- tube 5 : tous les réactifs sont frais, sauf l'hypochlorite de sodium.

Les résultats sont réunis dans le tableau n°XVII (page 61).

Seul le tube renfermant le phénate de sodium conservé présente une diminution marquée. Ce réactif est capable d'entraîner des erreurs de dosage par sa mauvaise conservation.

Afin de diminuer les risques d'altération, nous avons pris pour tous les réactifs les précautions suivantes :

- conservation à + 4°C,
- réactifs maintenus dans des bouteilles teintées bouchant à l'émeri,
- renouveler le phénate de sodium toutes les trois semaines.

La réaction de Lubochinsky et Zalta, que nous venons d'étudier, présente un très grand intérêt. Aux avantages de simplicité, elle allie ceux de la spécificité. En effet, seul l'azote ammoniacal est dosé intégralement, alors qu'amines, acides aminés et autres dérivés n'interviennent pas.

Nous possédons donc une méthode quantitative et spécifique de l'ammoniaque dont la sensibilité permet d'envisager son utilisation en coprologie fonctionnelle.

QUATRIEME PARTIE

Application de la technique de Lubochinsky et Zalta au dosage de l'ammoniaque dans les selles

-:-

Comme nous l'avons vu précédemment, la réaction de Lubochinsky et Zalta ne dose que l'azote ammoniacal. Aussi avons-nous mis en application cette méthode pour doser l'ammoniaque dans les dilutions fécales en vue d'une plus grande précision.

-:-

- I -

M E T H O D E

A - REACTIFS

- *Solution de phénate de sodium :*

Phénol	4,3 ml
Soude N	62,5 ml
Eau distillée q.s.p.	100 ml

- *Solution de tampon phosphate pH = 12 :*

Solution aqueuse de phosphate disodique ($12\ H_2O$) à 3,58 p 100	50 ml
Soude N	6,65 ml
Eau distillée q.s.p.	200 ml

- *Solution de nitroprussiate de sodium à 1 pour 2000 :*

préparée extemporanément à partir d'une solution à 1 p 100.

- *Solution d'hypochlorite de sodium à 4° chlorométrique :*

préparée à partir d'une solution d'hypochlorite de sodium à 20° chlorométriques.

B - TECHNIQUE

Le dosage fécal de l'ammoniaque par la méthode de Lubochinsky et Zalta comporte trois stades :

- dilution fécale,
- défécation,
- dosage.

1) Dilution fécale :

La dilution des selles est conditionnée par la sensibilité de la réaction de Lubochinsky et Zalta. En effet, la réaction est possible entre 1 et 12,25 µg d'azote dans la prise d'essai (0,5 ml).

D'après les résultats de la méthode de Goiffon et Nepveux, nous savons que le taux moyen d'azote est de l'ordre de 30 mg pour 100 g de selles. La dilution souhaitable devra être comprise entre 1/10e et 1/100e : nous avons adopté une concentration intermédiaire de 1/30e.

Nous faisons tout d'abord une dilution au 1/10e soit 15 g de selles dans 150 ml d'eau distillée. La dilution au 1/3 se fait ultérieurement.

2) Clarification :

A la dilution au 1/10e, nous ajoutons 1 ml de solution officinale de perchlorure de fer et un grand excès de chaux, afin d'éliminer du milieu le maximum de débris. Le filtrat est coloré en jaune.

3) Dosage :

Le filtrat précédent est dilué au 1/3 avec de l'eau distillée. A une prise d'essai de 0,5 ml de cette dilution au 1/30e nous ajoutons:

- 2 ml de solution de phénate de sodium,
- 2 ml de tampon phosphate,
- 2 ml de nitroprussiate de sodium,
- 0,5 ml d'hypochlorite de sodium.

Après avoir complété à 20 ml avec de l'eau distillée, on laisse à l'obscurité une demi heure. La lecture est faite à 6 100 nm.

Les résultats sont lus sur la droite et exprimés en ml d'azote pour 100 g de selles.

- II -

INTERPRETATION DES RESULTATS FOURNIS PAR LA METHODE DE LUBOCHINSKY-ZALTA ET PAR LA METHODE DE GOIFFON ET NEPVEUX

Avant de comparer les résultats obtenus par ces deux méthodes et de les interpréter, nous allons revenir sur l'aspect théorique qui découle des dosages pratiqués comparativement par ces deux méthodes sur des solutions pures.

A - *CONSIDERATIONS THEORIQUES*

1) Dosage de solutions pures :

Les dosages portent sur des solutions de sel d'ammonium, d'acides aminés et amines.

- Sel d'ammonium :

La réaction de Lubochinsky et Zalta dose intégralement l'azote ammoniacal quelle que soit sa concentration. En revanche, le dosage de Goiffon et Nepveux fournit des résultats par défaut (comme nous l'avons vu précédemment en conservant le terme du dosage au rose). Des trois concentrations différentes de chlorure d'ammonium considérées (voir tableau XVIII, page 68), aucune n'est dosée intégralement et nous constatons que la précision du dosage diminue avec la concentration en azote.

TABLEAU XVIII

Comparaison des dosages de Lubochinsky et de Goiffon sur des solutions de chlorure d'ammonium

Concentration de $Cl\ NH_4$ en g/100 ml	*Concentration de $ClNH_4$ en mg d'N/20 ml*	*Azote dosé en mg/20 ml*		*p 100 d'azote dosé*	
		Méthode de Goiffon	*Méthode de Lubochinsky*	*Méthode de Goiffon*	*Méthode de Lubochinsky*
0,05	2,64	2,52	2,56	95	98
0,007	0,33	0,21	0,33	63	100
0,005	0,264	0,112	0,264	42	100

- *Amines :*

TABLEAU XIX

Comparaison des dosages de Lubochinsky et de Goiffon sur des solutions d'amines

Solutions	*Concentration (g pour 100 ml)*	*p 100 d'azote dosé*	
		Lubochinsky	*Goiffon*
Ethanolamine	0,46	0,99	99
Cadavérine	0,34	0,9	95
Putrescine	0,33	0,53	85
Histamine	1,4	0,4	84
Phényl-éthylamine	0,92	0,05	97

Les amines qui ne sont pas dosées par la réaction de Lubochinsky et Zalta le sont en majeure partie par la méthode de Goiffon et Nepveux.

- *Acides aminés :*

TABLEAU XX

Comparaison des dosages de Lubochinsky et de Goiffon sur des solutions d'acides aminés

Solutions	*Concentration (g pour 100 ml)*	*p 100 d'azote dosé*	
		Lubochinsky	*Goiffon*
Glycocolle	0,56	3,3	91
Alanine	0,67	2,9	46
Arginine	0,56	1,3	39
Leucine	1	0,5	42
Lysine	0,55	0,09	50
Histidine	1,3	0	31
Sérine	0,79	0	97
Cystéine	1,3	0	55
Tryptophanne	1,5	0	34
Tyrosine	1,3	0	17

Les composés ne sont pas dosés par la réaction de Lubochinsky et Zalta. La méthode de Goiffon et Nepveux les dose en partie, mais de façon variable.

2) *Interprétation :*

D'après les résultats obtenus avec les solutions pures, nous pouvons établir des rapports entre ces deux dosages et ceci dans le cas où les trois composés azotés sont susceptibles d'être trouvés ensemble.

Trois possibilités peuvent être envisagées :

- *Ammoniaque seule :*

Les résultats de LUBOCHINSKY et ZALTA sont toujours supérieurs à ceux donnés par GOIFFON et NEPVEUX. La différence est d'autant plus marquée que la concentration en ammoniaque est moindre.

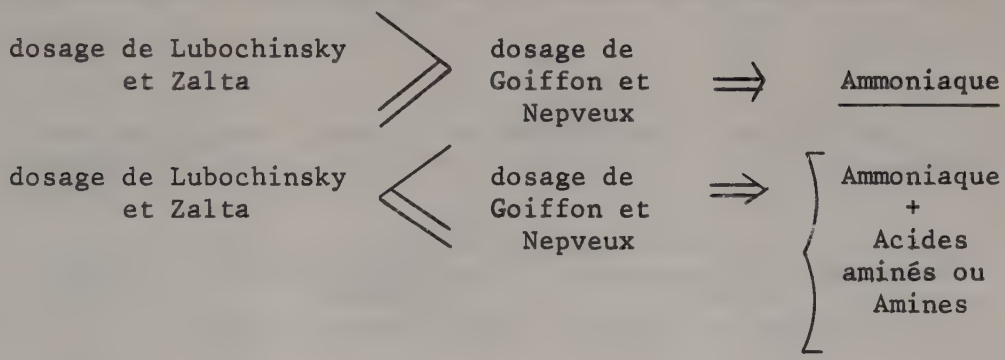
- *Acides aminés seuls, amines seuls ou acides aminés et amines :*

Ces deux composés azotés ne sont pratiquement pas dosés par la technique de Lubochinsky et Zalta. Celle de Goiffon et Nepveux peut fournir des valeurs élevées et sera donc toujours supérieure à la première.

- *Ammoniaque et acides aminés ou amines :*

Le défaut du dosage de l'ammoniaque par la méthode de Goiffon et Nepveux est ici susceptible d'être compensé par la présence des acides aminés ou des amines qui ne sont pas dosés par la méthode de Lubochinsky et Zalta. Par conséquent, le dosage de Goiffon et Nepveux fournira des résultats égaux ou supérieurs à ceux correspondant à la technique de Lubochinsky et Zalta.

Ces éléments d'interprétation se résument schématiquement ainsi :



B - INTERET CLINIQUE

1) *Résultats comparés des dosages coprologiques par la méthode de Goiffon et Nepveux et par la technique de Lubochinsky et Zalta :*

Afin de savoir s'il y a dissociation des résultats obtenus par ces deux réactions, nous les avons testées sur de nombreuses selles et nous présentons quelques-unes des valeurs trouvées.

On peut distinguer principalement trois catégories :

a) Dosage de Lubochinsky et Zalta = dosage de Goiffon et Nepveux :

Selles (réf.)	*mg d'N/100 g de selles*	
	Dosage de Lubochinsky et Zalta	*Dosage de Goiffon et Nepveux*
4490	15,6	14
4470	13,8	15,4
4420	18	18,9
4742	230	234,5
5149	492	455
4821	167	147
4477	96	93,8

b) Dosage de Lubochinsky et Zalta > dosage de Goiffon et Nepveux :

Selles (réf.)	*mg d'N/100 g de selles*	
	Dosage de Lubochinsky et Zalta	*Dosage de Goiffon et Nepveux*
4363	87	47
4416	23,1	9,1
4417	76,8	54,6
4464	173	136
4396	144	98
4409	114	84
4403	78,6	21,7

c) Dosage de Lubochinsky et Zalta < dosage de Goiffon et Nepveux :

Selles (réf.)	*mg d'N/100 g de selles*	
	Dosage de Lubochinsky et Zalta	*Dosage de Goiffon et Nepveux*
4703	66	80
4768	37,5	64,4
4369	93	148
4383	30	151
4372	19,5	106,4
4767	31	136
4475	117	135

Les valeurs que nous exposons dans ce paragraphe mettent en évidence qu'il peut exister une dissociation parfois importante dans les résultats que nous obtenons par ces deux méthodes.

Nous essayons d'interpréter ces différences en vue d'un diagnostic biologique plus précis.

2) *Valeurs normales :*

Par la méthode de Goiffon, une selle normale nécessite 3 ml de soude N/10 pour une prise d'essai de 20 ml d'une dilution au dixième, ce qui correspond à une concentration approximative de 45 à 85 mg d'azote pour 100 g de selles.

Des 150 analyses que nous avons soumises à la technique de Lubochinsky et Zalta, nous en déduisons que les valeurs normales, qui correspondent à celle-ci, se situent aux environs de 30 à 60 mg d'azote pour 100 g de selles.

3) *Interprétation des différences fournies par les deux méthodes :*

Pour interpréter les dissociations que nous avons relevées entre les résultats obtenus par les deux méthodes, nous nous reportons aux considérations théoriques que nous avons précédemment exposées. Cette interprétation doit, en outre, tenir compte du fait que la technique de Lubochinsky et Zalta correspond spécifiquement à l'ammoniaque et que celle de Goiffon et Nepveux fait une part à chacun des composés

azotés et ceci dans des proportions imprécises.

1er cas : dosage de Lubochinsky et Zalta = dosage de Goiffon et Nepveux :

Lorsque les résultats sont égaux, le dosage en principe ne porte que sur l'ammoniaque si les valeurs trouvées sont élevées. Si elles sont faibles, les résultats du dosage de Goiffon peuvent faire une part aux acides aminés et aux amines.

Du point de vue de la physiopathologie ce sont surtout les valeurs élevées qu'il y a lieu de considérer, exemple :

Selles (réf)	*N en mg/100 g de selles*	
	Lubochinsky-Zalta	*Goiffon-Nepveux*
5149	492	455

LUBOCHINSKY et ZALTA présentant une valeur très élevée traduit une grande quantité d'ammoniaque. On considère que le dosage de Goiffon lui est égal étant donné ses résultats par défaut comme nous l'avons vu précédemment.

2ème cas : dosage de Lubochinsky et Zalta > dosage de Goiffon et Nepveux :

Lorsque le dosage de Lubochinsky et Zalta est supérieur au dosage de Goiffon et Nepveux, cela traduit la prédominance de l'ammoniaque dans le milieu, exemple :

Selles (réf.)	*mg N/100 g de selles*	
	Lubochinsky-Zalta	*Goiffon-Nepveux*
4409	114	84
4396	144	98
4464	173	136

Dans les trois exemples l'ammoniaque est en quantité importante et la différence des résultats s'explique par la précision des méthodes.

3ème cas : dosage de Lubochinsky et Zalta < dosage de Goiffon et Nepveux :

Dans ce cas là, la présence d'ammoniaque est dominée à un degré variable par celle des amines et des acides aminés.

Selle (Réf.)	Azote en mg/100 g de selles	
	Lubochinsky-Zalta	Goiffon-Nepveux
4369	93	148

La valeur élevée de Lubochinsky et Zalta exprime une présence importante d'ammoniaque. Le dosage de Goiffon indique qu'il y a, en outre, des amines ou des acides aminés. Il en est de même pour l'exemple :

Selle (Réf.)	Azote en mg/100 g de selles	
	Lubochinsky-Zalta	Goiffon-Nepveux
4475	117	135

L'interprétation que nous avons pu faire sur ces quelques dosages, des différences fournies par les deux méthodes est fondée uniquement sur leurs seules valeurs respectives. Nous allons donc envisager à présent l'interprétation clinique.

4) Interprétation clinique :

L'interprétation clinique des résultats d'une analyse fécale doit intégrer notamment l'ensemble des renseignements chimiques (pH, acides organiques), des résidus alimentaires (fibres musculaires, cellulose tendre, amidon), de la consistance des selles, de la flore qu'elles renferment, de l'état des pigments biliaires, du mucus et des protéines dissoutes.

L'ammoniaque est le témoin de l'activité de la flore de putréfaction dont la prolifération dépend de l'abondance des protéines mises à sa disposition. La présence de ces protéines est essentiellement en rapport avec l'état de la muqueuse.

A la faveur de ces notions, nous essayons d'interprêter quelques analyses coprologiques en insistant sur l'intérêt du dosage de Lubochinsky et Zalta afin d'en préciser l'utilité clinique.

Les exemples que nous allons discuter sont groupés suivant les résultats correspondant au dosage de Goiffon et Nepveux :

- normaux ou faibles,
- forts.

Dans chacune de ces catégories les observations sont classées selon la valeur relative des deux méthodes.

a) Valeurs faibles du dosage de Goiffon et Nepveux :

1) Lubochinsky et Zalta = Goiffon-Nepveux :

- Analyse n° 4420 :

Dosage de Lubochinsky	18
Dosage de Goiffon	18,9
Acides organiques	23
pH	5
Protéines non dégradées	0
Protéines dégradées	89
Bilirubine	0
Flore iodophile	+++
Consistance	moulée pâteuse

Le dosage de Goiffon et Nepveux donne 18,9 ce qui est un taux très bas. C'est une selle de transit rapide (consistance pâteuse, flore iodophile abondante) et la flore de fermentation est très active (A.O.= 23, pH très acide). En ne considérant que le dosage de Goiffon et Nepveux, nous en déduisons que c'est strictement une selle de fermentation. Le dosage de Lubochinsky qui est de 18 n'apporte aucune information complémentaire.

-Référence n° 4470 =

Dosage de Lubochinsky et Zalta	13,8
Dosage de Goiffon et Nepveux	15,4
Acides organiques	11,5
pH	5,3
Protéines non dégradées	0
Protéines dégradées	58
Bilirubine	0
Flore iodophile	++++
Consistance	diarrhée

C'est une selle de transit très rapide (diarrhée, flore iodophile très abondante). Le dosage de Goiffon montre qu'il n'y a pas de putréfactions (15,4) et les acides organiques 11,5 qu'il n'y a pas de fermentations.

Nous avons affaire à une selle de transit accéléré et le dosage de LUbochinsky n'apporte aucun élément intéressant.

- Référence n°4400 :

Dosage de Lubochinsky et Zalta ..	23,7
Dosage de Goiffon et Nepveux	23,1
Acides organiques	21
pH	5,35
Protéines non dégradées	0
Protéines dégradées	118
Bilirubine	0
Flore iodophile	++++ cellulose tendre F. musculaire
Consistance	moulée pâteuse

Le dosage de Goiffon et Nepveux étant faible élimine un syndrome de putréfactions. C'est une selle de transit rapide (pâteuse, flore iodophile très abondante, cellulose tendre, fibres musculaires). Cette selle présente des fermentations (pH = 5,3 - A.O. = 21), uniquement et, comme on s'y attendait, le dosage de Lubochinsky et Zalta n'apporte rien.

Dans les trois exemples que nous venons de voir, l'apport du dosage de Lubochinsky et Zalta n'est pas utile pour l'interprétation.

2) Dosage de Goiffon-Nepveux < dosage de Lubochinsky-Zalta :

- Référence n°4363 :

Dosage de Lubochinsky et Zalta ..	87
Dosage de Goiffon et Nepveux	47
Acides organiques	21
pH	6,1
Protéines non dégradées	0
Protéines dégradées	108
Bilirubine	0
Flore iodophile	+++
Consistance	bouse

Le dosage de Goiffon-Nepveux est normal. Nous constatons quelques fermentations (A.O. = 21 - pH = 6,15) et une accélération de transit (flore iodophile abondante, bouse).

Si nous considérons le dosage de Lubochinsky-Zalta, le diagnostic reste le même puisqu'il nous donne une valeur d'ammoniaque normale.

- Référence n°4416 :

Dosage de Lubochinsky et Zalta ..	23,1
Dosage de Goiffon et Nepveux	9,1
Acides organiques	20
pH	5,25
Protéines non dégradées	0
Protéines dégradées	84

Bilirubine	0
Flore iodophile	+++
Consistance	moulée pâteuse

Nous nous trouvons dans le même cas que la selle précédente : pas d'ammoniaque, quelques fermentations (A.O. = 20 - pH = 5,25) et un transit un peu accéléré (pâteuse, flore iodophile abondante).

Le diagnostic peut très bien être fait sans l'apport de Lubochinsky-Zalta.

- Référence n°4417 :

Dosage de Lubochinsky et Zalta	76,8
Dosage de Goiffon et Nepveux	54,6
Acides organiques	20
pH	6,85
Protéines non dégradées	0
Protéines dégradées	101
Bilirubine	0
Flore iodophile	0
Consistance	moulée ferme

En ne considérant au départ que le dosage de Goiffon et Nepveux, nous voyons que la quantité d'ammoniaque est normale. Les acides organiques à 20 indiquent quelques fermentations qui ne sont pas très importantes, puisque le pH est normal 6,85. La consistance est ferme, il n'y a pas de flore iodophile, nous nous trouvons en présence d'une selle normale d'après ces données. Le dosage de Lubochinsky et Zalta (76,8) confirme le diagnostic.

Ces trois exemples de selles montrent que lorsque le dosage de Goiffon est inférieur au dosage de Lubochinsky, ce dernier n'apporte aucun élément nouveau pour l'interprétation ou du moins ne fait que confirmer le diagnostic déjà établi.

3) Dosage de Goiffon et Nepveux > dosage de Lobuchinsky et Zalta :

- Analyse n°4703 :

Dosage de Lubochinsky et Zalta	66
Dosage de Goiffon et Nepveux	80
Acides organiques	28
pH	6,5
Protéines non dégradées	71
Protéines dégradées	40
Bilirubine	0
Quelques fibres musculaires	
Consistance	moulée ferme
Flore iodophile	quelques éléments.

Le dosage de Goiffon montre une valeur à peu près normale : 80.

Les acides organiques élevés font penser à un syndrome de fermentation (28), d'autant que le pH est plutôt acide (6,5). Si nous considérons alors le dosage de Lubochinsky, nous voyons qu'il est inférieur au dosage de Goiffon dans des proportions qui permettent de penser que ce dernier englobe quelques acides aminés. Il n'en demeure pas moins que c'est une selle de fermentation.

- Référence n°4768 :

Dosage de Lubochinsky et Zalta ..	37,5
Dosage de Goiffon et Nepveux	64,4
Acides organiques	31
pH	4,9
Protéines non dégradées	0
Protéines dégradées	83,5
Bilirubine	0
Flore iodophile	++++
Consistance	bouse.

Comme l'analyse précédente, nous avons un syndrome de fermentation très importante (A.O. = 31 - pH = 4,9) pour lequel le dosage de Lubochinsky n'est pas nécessaire pour le diagnostic.

CONCLUSION :

Dans les trois catégories d'exemples que nous avons choisis, en demeurant dans les valeurs faibles du dosage de Goiffon-Nepveux,nous avons remarqué que le dosage de Lubochinsky-Zalta n'apporte pas d'éléments nouveaux pour l'interprétation, et que le diagnostic peut être posé sans son concours. Donc pour des valeurs faibles d'ammoniaque,le dosage de Lubochinsky-Zalta est inutile.

b) Valeurs fortes du dosage de Goiffon et Nepveux :

Nous allons envisager trois catégories comme précédemment.

1) Dosage de Goiffon-Nepveux = dosage de Lubochinsky et Zalta :

- Analyse n°4742 :

Dosage de Lubochinsky et Zalta ..	230
Dosage de Goiffon et Nepveux	234,5
Acides organiques	30,7
pH	6,6
Protéines non dégradées	0
Protéines dégradées	26
Bilirubine	0
Flore iodophile	+++
Consistance	grumeleuse.

En ne considérant que le dosage de Goiffon et Nepveux, 234,5 représente une valeur très élevée et l'on ne peut pas savoir si elle ne se rapporte qu'à l'ammoniaque, en quantité très importante, ou bien si la présence anormale d'acides aminés ou d'amines intervient. Il y a un syndrome de fermentation (A.O. = 30,7 - pH = 6,6) et un transit un peu accéléré.

Le dosage de Lubochinsky et Zalta apporte l'assurance qu'il n'y a que de l'ammoniaque en quantité très importante traduisant également un syndrome de putréfaction.

Nous avons donc fermentation et putréfaction dans cette selle et l'on peut supposer que la fermentation qui s'est produite primitivement a irrité la muqueuse digestive d'où cette putréfaction importante.

- Référence n° 4821 :

Dosage de Lubochinsky et Zalta ..	167
Dosage de Goiffon et Nepveux	147
Acides organiques	18
pH	8
Protéines non dégradées	0
Protéines dégradées	138
Bilirubine	0
Flore iodophile	(+)
Consistance	moulée ferme.

Les acides organiques sont normaux ; le pH est très alcalin et les protéines dissoutes sont abondantes, irritation de la muqueuse. Si l'on considère seulement le dosage de Goiffon et Nepveux, on note une valeur très élevée. On suppose une prédominance d'ammoniaque, mais la présence d'autres substances alcalinisantes n'est pas exclue.

Le dosage de Lubochinsky et Zalta confirme qu'il n'y a que de l'ammoniaque, c'est une selle de putréfaction.

Lorsque les deux méthodes de dosages présentent des valeurs élevées et égales, l'apport du dosage de Lubochinsky est indispensable pour le diagnostic.

2) Dosage de Goiffon et Nepveux < dosage de Lubochinsky et Zalta :

- Référence n°4464 :

Dosage de Lubochinsky et Zalta ..	173
Dosage de Goiffon et Nepveux	136
Acides organiques	9
pH	7,9
Protéines non dégradées	80
Protéines dégradées	16

Bilirubine	0
Flore iodophile	0
Consistance	liquide.

Le dosage de Goiffon et Nepveux est très élevé alors que les acides organiques sont effondrés (déficience de la flore de fermentation) et que le pH est très alcalin. On pense immédiatement à une selle de putréfaction et le dosage de Lubochinsky confirme le diagnostic.

- Référence n°4396 :

Dosage de Lubochinsky et Zalta	144
Dosage de Goiffon et Nepveux	98
Acides organiques	21
pH	7,1
Protéines non dégradées	0
Protéines dégradées	145
Bilirubine	0
Flore iodophile	0
Consistance	moulée ferme.

Le dosage de Goiffon et Nepveux est à peine supérieur à la normale. Les acides organiques à 21 indiquent quelques fermentations, mais le pH est normal. Cependant, le dosage de Lubochinsky-Zalta avec 144 révèle un syndrome de putréfaction qui allait passer inaperçu.

- Référence n°4409 :

Dosage de Lubochinsky et Zalta	114
Dosage de Goiffon et Nepveux	84
Acides organiques	26,3
pH	6,2
Protéines non dégradées	0
Protéines dégradées	33,5
Bilirubine	0
Flore iodophile	0
Consistance	liquide

Si nous ne considérons que le dosage de Goiffon, il n'y a pas de putréfaction ; les acides organiques (26,3) et le pH acide dénotent une fermentation ; c'est le diagnostic que l'on pose en présence de ces éléments. Cependant le dosage de Lubochinsky et Zalta (114) met en évidence qu'une putréfaction lui est associé.

C'est donc une selle de fermentation et de putréfaction.

Dans ce groupe d'exemple ou le dosage de Goiffon et Nepveux est inférieur au dosage de Lubochinsky, ce dernier apporte un élément important dans la précision de la qualité des valeurs trouvées par Goiffon et Nepveux. Il devient alors indispensable.

3) Dosage de Goiffon et Nepveux > dosage de Lubochinsky et Zalta :

- Référence n°4383 :

Dosage de Lubochinsky et Zalta ..	30
Dosage de Goiffon et Nepveux	151
Acides organiques	20
pH	4,8
Protéines non dégradées	0
Protéines dégradées	32
Bilirubine	0
Flore iodophile	++++
Cellulose tendre et amidon	
Consistance	bouse.

Le dosage de Goiffon et Nepveux = 151, ce qui fait penser à des putréfactions. Mais, il y a en outre des fermentations (A.O. = 20 - pH = 4,8), et une accélération de transit (flore iodophile abondante, présence de cellulose tendre et d'amidon).

Cependant le dosage de Lubochinsky, qui est de 30, élimine toute idée de putréfaction. C'est seulement une selle de fermentation avec transit rapide.

- Référence n°4372 :

Dosage de Lubochinsky et Zalta ..	19,5
Dosage de Goiffon et Nepveux	106,4
Acides organiques	13
pH	6,65
Protéines non dégradées	0
Protéines dégradées	69,5
Bilirubine	++
Cellulose tendre	
Consistance	moulée pâteuse.

Le dosage de Goiffon et Nepveux à 106,4 ne s'accorde pas avec le pH acide de 6,65, s'il ne correspond qu'à de l'ammoniaque. Il n'y a pas de fermentations (pH = 6,65).

La valeur du dosage de Lubochinsky et Zalta à 19,5 confirme que le résultat de Goiffon correspond à des acides aminés ou des amines.

- Référence n°4767 :

Dosage de Lubochinsky et Zalta ..	31
Dosage de Goiffon et Nepveux	136
Acides organiques	18
pH	5,6
Protéines non dégradées	0
Protéines dégradées	75

Bilirubine 0
Cellulose tendre - fibres musculaires
Consistance ..... bouse

Les acides organiques sont normaux (18) et le dosage de Goiffon et Nepveux est très élevé : 136. Cependant, le pH bas (5,6) ne donne pas l'impression d'une selle de putréfaction, d'autant que le transit est un peu accéléré (bouse, cellulose tendre, fibres musculaires).

Le dosage de Lubochinsky et Zalta confirme qu'il n'y a pas putréfaction, mais que nous sommes en présence d'une quantité anormale d'acides aminés et d'amines.

Comme nous venons de le voir, le dosage de Lubochinsky et Zalta ne présente un intérêt pour l'interprétation des analyses fécales, que dans la mesure où le dosage de Goiffon et Nepveux prend une valeur supérieure à la normale, c'est-à-dire au dessus de 80 mg d'azote pour 100 g de selles.

En effet, une précision doit être apportée pour savoir si l'on a affaire à de l'ammoniaque seule ou bien à des acides aminés ou des amines.

C O N C L U S I O N S

Pour doser l'azote aminé dans les selles, on utilise classiquement la méthode de Goiffon et Nepveux, qui applique le principe du dosage au formol de Sörensen et qui porte tout à la fois sur l'ammoniaque, les amines et les acides aminés.

En pathologie, il semblerait intéressant de pouvoir dissocier le dosage de l'ammoniaque et celui des acides aminés.

Dans ce but, notre étude s'est orientée vers la recherche d'un dosage spécifique de l'ammoniaque, qui soit applicable en coprologie.

Notre travail a été guidé par deux critères :

- la spécificité à l'égard de l'ammoniaque ;
- la simplicité en vue d'une utilisation courante par le laboratoire de biologie clinique.

La première partie est consacrée à l'analyse critique du dosage des acides aminés et de l'ammoniaque par la technique au formol.

L'application de cette technique au dosage des acides aminés par Sörensen est beaucoup trop compliquée et manque de sensibilité par suite du faible coefficient de dissociation de certains aminoacides qui impose de prendre le rouge vif comme terme du virage de la phénol phtaléine.

Le même principe appliqué à l'ammoniaque par RONCHESE est au contraire satisfaisant par sa simplicité, puisqu'il est possible d'arrêter la réaction au début du virage de la phénol phtaléine. Mais,

lorsque la méthode de Ronchèse s'adresse à un mélange ammoniaque - acides aminés, son manque de spécificité est tel que le dosage porte à la fois sur l'ammoniaque et une partie des aminoacides. Or les selles renferment à la fois ces deux composés.

La technique de Goiffon et Nepveux permet un dosage global à condition de pousser le réaction jusqu'au rouge avec les inconvénients analysés pour la méthode de Sörensen. En se limitant au rose pâle, elle dose une partie des acides aminés, plus ou moins importante selon leur nature et l'ammoniaque, en partie ou en totalité, selon sa concentration.

Pour rendre la méthode de Goiffon applicable à un dosage global pratique, nous avons essayé différents indicateurs de pH sans obtenir de résultats intéressants.

Pour permettre un dosage fractionné par cette même méthode nous l'avons combiné avec l'emploi de résines échangeuses d'ions. L'une d'elles, de nature anionique, permet une séparation satisfaisante entre les acides aminés qu'elle retient, et l'ammoniaque qu'elle laisse passer avec les amines. Cette solution de fractionnement est possible mais peu pratique, ce qui nous a conduit à rechercher une méthode de dosage spécifique de l'ammoniaque.

Nous nous sommes adressé à la réaction de Berthelot, appliquée selon la technique de Lubochinsky et Zalta en raison des avantages de simplicité, de spécificité et de sensibilité qu'elle présente vis-à-vis de l'ammoniaque. Parmi les dérivés aminés c'est le seul à être dosé ; de plus, aucune substance habituellement présente dans les selles ne donne cette réaction.

En outre, de par sa sensibilité, la technique de Lubochinsky et Zalta est parfaitement adaptée aux concentrations des aminoacides dans les selles. Nous l'avons donc appliquée au dosage spécifique de l'ammoniaque fécale.

Les résultats qu'elle a fourni avec 150 selles également soumises à la technique de Goiffon et Nepveux, montrent que, dans tous les cas où cette dernière conduit à des valeurs élevées, notre méthode présente un intérêt en précisant la nature de l'anomalie :

- Lubochinsky et Zalta également élevé : *excès d'ammoniaque*.
- Lubochinsky et Zalta voisin de la normale : *aminoacidorrhée*.

L'association de ces deux méthodes en permettant une dissociation entre une aminoacidorrhée et une putréfaction devrait apporter des éléments nouveaux à la Clinique.

B I B L I O G R A P H I E

- BERTHELOT (M.). - 1859 Répertoire de chimie appliquée. 1, 284.

- BRØNSTED (J.N.). - 1928 Acid and basic catalysis.
Chemical reviews, 5, 231.

- DENIGES (G.), CHELLE (L.) et LABAT (A.). - 1930 Précis de chimie analytique.
Maloine Ed. Paris, 1, 528-529.

- DENIGES (G.), CHELLE (L.) et LABAT (A.). - 1931 Précis de chimie analytique.
Maloine Ed. Paris, 2, 490.

- GOIFFON (R.). - 1949 Manuel de coprologie clinique.
Masson Ed. Paris, 87-88.

- JENSEN (M.R.), LARROUDE (M.F.), ESPAGNE (M.). - 1970 Détermination de l'azote aminé d'un hydrolysat de protéines.
Bull. Soc. Pharm., Bordeaux, 109, 161-168.

- LARROUDE-GARDE (M.F.). - 1971 Contribution à l'étude du dosage de l'azote aminé des hydrolysats de protéines.
Thèse Pharm. Bordeaux, n° 611.

- LE HENAFF (Ph.). - 1965 Contribution à l'étude des réactions de condensation des amines aliphatiques avec le formol.
Bull. Soc. Chim.de France, 11, 3113-3130.

- LEVY (M.). - 1933 Equilibria in the formol titration.
J. Biol. Chem., 99, 767-769.

- LUBOCHINSKY (B.) et ZALTA (J.P.). - 1954 Microdosage colorimétrique de l'azote ammoniacal.
Bulletin de la Société de chimie biologique, 36, 1363-1366.

- MATHIEU (H.). - 1934 Manuel d'analyse chimique qualitative et quantitative.
Masson Ed. Paris, 1, 517-524.

- POLONOVSKY (C.) et COLIN (J.). - 1963 Exploration biologique en pédiatrie.
Exp. Scientifique Française, Paris, 491.

- RONCHESE (A.). - 1915 Guide pratique pour l'analyse des urines.
Lib. Baillières, Paris, 40-43.

- RUSSEL JANE (A.). - 1944 The colorimetric estimation of small amounts of ammonia by the phénol-hypochlorite reaction.
Journal of Biological Chemistry, 156, 457-461.

- TAUZIN (J.). - 1958 Guide coprologique pour l'interprétation clinique pour l'interprétation clinique de l'examen des selles.
Masson Ed. Paris, 64-71.

- THOMAS (P.). - 1912 Bull. Soc. Chim. de France, 4ème série, 11, 796-799.

Editions BERGERET - 71-73, rue Leyteire - Bordeaux - Tél. 91.12.59 -

TABLE DES MATIERES

Pages

- I N T R O D U C T I O N 3

- PREMIERE PARTIE - Dosage de l'ammoniaque et des dérivés aminés par la technique au formol 6

I - Dosage des acides aminés : méthode de Sörensen 8

A) Principe 8
B) Facteurs 10

1) pH 10
2) Formol 11
3) Titre de la solution alcaline 11

C) Réactifs 11
D) Technique 11

- Première phase : alcalinisation du témoin 11
- Deuxième phase : alcalinisation de la solution 12
- Troisième phase: ajustement du témoin 12
- Quatrième phase: ajustement de la solution 12

E) Calculs 12
F) Résultats 15
G) Inconvénients 15

1) Méthode compliquée 15
2) Manque de spécificité 15
3) Difficulté liée à la technique 15

II - Dosage de l'ammoniaque : méthode de Ronchèse 17

A) Principe 17

a) Ammoniaque 17
b) Sels ammoniacaux 17

B) Réactifs 18

Pages

C) Technique 18
D) Calculs 18
E) Valeur de la technique 19

1) Simplicité 19
2) Reproductibilité 19
3) Spécificité 19

DEUXIEME PARTIE - Valeur de la méthode au formol appliquée au dosage de l'azote aminé fécal par Goiffon et Nepveux ; modifications 20

I - La méthode de Goiffon et Nepveux 22

A) Réactifs 22
B) Technique 22

a) Clarification de la dilution fécale 22
b) Dosage 22

C) Calculs 24
D) Avantages 24
E) Inconvénients 24

II - Valeur de la méthode de Goiffon et Nepveux 25

A) Méthode 25
B) Résultats 25

1) Sels ammoniacaux 25
2) Amines 29
3) Acides aminés 30

III - Essais de modifications de la méthode de Goiffon et Nepveux 32

A) Virage de la phénol phtaléine 32

1) Principe 32
2) Technique 32
3) Résultats 32
4) Comparaison des résultats en fonction de la teinte prise par la phénol phtaléine 32

B) Choix d'un nouvel indicateur 34

1) Phénol phtaléine - Rouge crésol 35
2) Phénol phtaléine - Thymol phtaléine 35
3) Thymol phtaléine - Rouge neutre 37

Pages

C) Fractionnement par les résines échangeuses d'ions 39

1) Principe 39
2) Technique 42
3) Résultats 43

TROISIEME PARTIE - Dosage spécifique de l'ammoniaque 48

I - Méthode de Lubochinsky et Zalta 50

A) Principe 50
B) Réactifs 50
C) Technique 51

II - Etude analytique de la méthode de Lubochinsky et Zalta 52

A) Influence de la longueur d'onde 52
B) Influence du temps sur l'évolution de la coloration 53
C) Caractère quantitatif 53
D) Sensibilité 56
E) Spécificité 56

a) Sels d'ammonium 56
b) Amines 57
c) Acides aminés 58
d) Composés divers 58

F) Conservation des réactifs 62

QUATRIEME PARTIE - Application de la technique de Lubochinsky et Zalta 63

I - Méthode 65

A) Réactifs 65
B) Technique 66

1) Dilution fécale 66
2) Clarification 66
3) Dosage 66

II - Interprétation des résultats fournis par la méthode de Lubochinsky et Zalta et par la méthode de Goiffon et Nepveux 67

A) Considérations théoriques 67

1) Dosage de solutions pures 67
2) Interprétation 69

Pages

B) Intérêt clinique 70

1) Résultats comparés des dosages coprologiques par la méthode de Goiffon et Nepveux et par la technique de Lubochinsky et Zalta 70

a) Dosage de Lubochinsky et Zalta = dosage de Goiffon et Nepveux 71
b) Dosage de Lubochinsky et Zalta > dosage de Goiffon et Nepveux 71
c) Dosage de Lubochinsky et Zalta < dosage de Goiffon et Nepveux 72

2) Valeurs normales 72
3) Interprétation des différences fournies par les deux méthodes 72

1er cas : Lubochinsky-Zalta = Goiffon-Nepveux 73
2ème cas : Lubochinsky-Zalta > Goiffon-Nepveux 73
3ème cas : Lubochinsky-Zalta < Goiffon-Nepveux 74

4) Interprétation clinique 74

a) Valeurs faibles du dosage de Goiffon-Nepveux 75

1er cas : Lubochinsky-Zalta = Goiffon-Nepveux 75
2ème cas : Lubochinsky-Zalta > Goiffon-Nepveux 76
3ème cas : Lubochinsky-Zalta < Goiffon-Nepveux 77

b) Valeurs fortes du dosage de Goiffon-Nepveux 78

1er cas : Goiffon-Nepveux = Lubochinsky-Zalta 78
2ème cas : Goiffon-Nepveux < Lubochinsky-Zalta 79
3ème cas : Goiffon-Nepveux > Lubochinsky-Zalta 81

C O N C L U S I O N S 83

EDITIONS BERGERET - 71/73,rue Leyteire -33000 BORDEAUX T.(56) 91.12.59